



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE FARMACIA

RESPUESTA HEMATO-NEUROLÓGICA EN ADULTOS Y LARVAS DE PEZ
CEBRA (*Danio rerio*) EXPUESTOS A LA ACRILAMIDA

Autor: Lcda. Claudia I. Hernández M.

Caracas, Diciembre de 2014



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE FARMACIA

POSTGRADO DE TOXICOLOGÍA



**RESPUESTA HEMATO-NEUROLÓGICA EN ADULTOS Y
LARVAS DE PEZ CEBRA (*Danio rerio*) EXPUESTOS A LA
ACRILAMIDA**

LICENCIADA EN BIOANÁLISIS CLAUDIA I. HERNÁNDEZ M.

Trabajo de Grado presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela para optar
al Título de Magister Scientiarum en Toxicología

Nro. Lft4872015615214 de Depósito Legal

TUTOR: DOCTOR MARCO A. ÁLVAREZ O.



VEREDICTO

Quienes suscriben, miembros del jurado designado por el Consejo de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela, para examinar el **Trabajo de Grado** presentado por la Licenciada en Bioanálisis **CLAUDIA INMACULADA HERNANDEZ MORENO C.I. 14.201.085**, bajo el título: "**RESPUESTA HEMATO-NEUROLÓGICA EN ADULTOS Y LARVAS DE PEZ CEBRA (Danio rerio) EXPUESTOS A LA ACRILAMIDA**", a fin de cumplir con el requisito legal para optar al grado académico de **MAGISTER SCIENTARIUM EN TOXICOLOGÍA**, dejan constancia de lo siguiente:

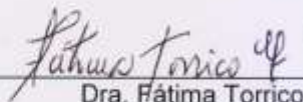
1.- Leído como fue dicho trabajo por cada uno de los miembros del jurado, se fijó el día viernes **12 de diciembre de 2014** a la **2:00 pm.**, para que **la autora** lo defendiera en forma pública, lo que **la autora** hizo en el **aula 703**, del **7^{mo}** Piso de la Facultad de Farmacia, mediante un resumen oral de su contenido, luego de lo cual **respondió** a las preguntas que le fueron formuladas por el jurado, todo ello conforme con lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado.

2.- Finalizada la defensa del trabajo, el jurado decidió **APROBARLO** por considerar, sin hacerse solidario con la ideas expuestas por **la autora**, que se ajusta a lo dispuesto y exigido en el Reglamento de Estudios de Postgrado.

Para dar este veredicto, el jurado estimó que el trabajo examinado constituye un aporte para el estudio de mecanismos de toxicidad de xenobióticos ambientales en un modelo experimental alternativo extrapolable al humano.



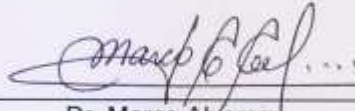
En fe de lo cual se levanta la presente ACTA, a los **doce** días del mes de **diciembre** del año **2014**, conforme a lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado, actuó como Tutor Coordinador del jurado el Dr. Marco Alvarez.



Dra. Fátima Torrico
C.I. V- 4.416.260
Facultad de Farmacia. UCV



Dra. Elizabeth Merentes
C.I. V- 3.565.514
IBE. Facultad de Ciencias. UCV



Dr. Marco Alvarez
C.I. 4.585.859
Tutor-Coordinador
Facultad de Medicina. UCV



ml. 12/12/2014

AGRADECIMIENTOS

A todas las instituciones y al personal que labora en las mismas por permitirme llevar a cabo el presente estudio.

.- Laboratorio de Microscopía Electrónica del Instituto Anatómico “José Izquierdo”, UCV especialmente a mi tutor el Dr. Marco Álvarez por brindarme más que conocimientos, amistad y apoyo moral.

.- A la Lcda. Lourdes Perdomo del Laboratorio de Microscopía Electrónica, por su aporte en esta investigación, apoyo incondicional y amistad.

.- Laboratorio de Hemoglobinas Anormales del Instituto Anatómico “José Izquierdo” UCV, en especial a la Dra. Martha Bravo por su disposición.

.- Laboratorio de Toxicología de La Escuela de Bioanálisis de la UCV, en especial a la Lcda. Yamilet Rivas por su apoyo, así como al Lcdo. Francisco Bello.

A la Profa. Gladys Romero de Galí por ser un motor impulsor y confiar en nuestras potencialidades. A la Profa. Fátima Torrico por su orientación.

A mi Madre por ser un pilar fundamental en mi vida y demostrarme siempre que el “*Tiempo de Dios es Perfecto*”. A Humberto por ser más que padre un amigo incondicional y guía espiritual. A mis hermanos, Ángela y Bienve, por el apoyo en todo momento y ser mucho más que mis hermanos mis grandes y mejores amigos.

A Oscar Armando por ser más que mi esposo, un ser incondicional que día a día me brindó una palabra de ánimo y fortaleza.

A mi familia por el apoyo durante mi desarrollo profesional, especialmente a mis tíos Vicente y Marco Antonio por ser grades ejemplos a seguir. A mi comadres Mariafrancia y Ziruma, a mis tías Almenia, Flor y Haidee, a mis pequeños Estefany Gabriela, Gabriel Alejandro y Víctor David.

A mis amigas por darme siempre una palabra de ánimo en los momentos de mayor estrés, especialmente a mi comadre Leidy, Adriana, Matilde, Kenia, Irene.

A Dios y a todos mis Santos por iluminar mi mente, brindarme fortaleza, perseverancia y constancia para culminar con éxito la presente investigación. Al Profesor Lino Valles por ser un guía espiritual.

A todos lo que contribuyeron en mi formación tanto profesional como personal.



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE FARMACIA

POSTGRADO DE TOXICOLOGÍA



RESPUESTA HEMATO-NEUROLÓGICA EN ADULTOS Y LARVAS DE PEZ CEBRA (*Danio rerio*) EXPUESTOS A LA ACRILAMIDA

Licenciada en Bioanálisis Claudia I. Hernández Moreno

RESUMEN

La acrilamida (ACR), un agente químico de procesado, es conocida por su acción sobre los tejidos, nervioso y hematopoyético. Sin embargo, las características morfo-funcionales de la acción tóxica sobre estos, no han sido claramente descritas. En esta investigación, se estudiaron las señales de daño sobre el sistema hematopoyético y estructuras sensoriales, en el modelo experimental de pez cebra (*Danio rerio*), adulto y larva, tratados con la concentración letal media (CL₅₀) de ACR. La hematotoxicidad, fue estudiada por histoquímica, analizando la morfología de células sanguíneas y por inmunohistoquímicas, las características tisulares del riñón, como órgano hematopoyético. Otros tejidos metabolizantes, fueron caracterizados. La estructura de la hemoglobina fue analizada por electroforesis y la actividad enzimática de la ALAD y la AChE, fue estimada por colorimetría. La neurotoxicidad, fue determinada por cambios en la actividad motora, analizando video-registros con el programa Tracker. La microscopia de fluorescencia y el análisis de la pigmentación, permitieron describir la estructura de los neuromastomas y los melanóforos, como unidades sensoriales. La acción tóxica de la ACR resultó dependiente de la concentración y del tiempo de exposición, con variabilidad del peso corporal. En comparación a los controles, los eritrocitos presentaron hipocromía y fragmentación nuclear. La presencia de una cuarta banda de hemoglobina fue evidenciada. Se observó discontinuidad del parénquima renal y hepático, así como apoptosis en ambos tejidos. La hiperplasia de células caliciformes y adelgazamiento del epitelio intestinal fue registrado. La actividad enzimática de ALAD y AChE, disminuyó en 20% y 46%, respectivamente. La actividad motora disminuyó en 56% en larvas y 70% en adultos. Los neuromastomas presentaron menor respuesta al marcaje fluorescente, con pérdida de la arquitectura celular. Los melanóforos presentaron forma redondeada, con disminución de la pigmentación. Los resultados describen las características morfo-funcionales de la acción tóxica de la ACR en el contexto de la hemato-neurotoxicidad planteada.

Palabras claves: Acrilamida, pez cebra, hemato-neurotoxicidad, aductos, hemoglobina, neuromastomas, melanóforos, ácido δ -aminolevulínico dehidratasa, acetilcolinesterasa.



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE FARMACIA
POSTGRADO DE TOXICOLOGÍA



HEMATO-NEUROLOGICAL RESPONSE IN ADULTS AND LARVAE ZEBRAFISH (*Danio rerio*) ACRYLAMIDE EXPOSED

Licenciada en Bioanálisis Claudia I. Hernández Moreno

SUMMARY

The Acrylamide (ACR) is a chemical processing compound which is known for its action on nervous and hematopoietic tissues. However, the morpho-functional characteristics of the toxic action on these have not been well explained. In this research, the signs of damage to the hematopoietic system and sensory structures in the experimental model of Zebrafish (*Danio rerio*), adults and larvae, treated with the median lethal concentration (LC₅₀) of ACR, were studied. The hematotoxicity was studied in a histochemical way, by analyzing the blood cells morphology and, in an immunohistochemical way, by analyzing the kidney tissue as a hematopoietic organ. Other metabolizing tissues were characterized. The hemoglobin structure was analyzed using electrophoresis and ALAD and AChE enzyme activity was evaluated using hemoglobin was analyzed by electrophoresis and enzyme activity of ALAD and AChE was estimated by colorimetry. Neurotoxicity was determined by changes in motor activity, analyzing video-records with the Tracker program. Fluorescence microscopy and analysis of the pigmentation let us describe the structure and the melanophores neuromastoms as sensory units. The toxic action of ACR resulted dependent on concentration and exposure time, with body weight variability. Compared to controls, erythrocytes showed hypochromic and nuclear fragmentation. The presence of a fourth band of hemoglobin was showed. Discontinuity of renal and hepatic parenchyma and apoptosis was observed in both tissues. Hyperplasia of goblet cells and intestinal epithelial thinning was recorded. The enzyme activity of ALAD and AChE decreased 20% and 46%, respectively. Motor activity decreased by 56% to 70% in larvae and adults. The neuromastoms had lower response to fluorescent labeling, with loss of cellular architecture. Melanophores presented rounded, with reduced pigmentation. The results describe the morpho-functional characteristics of the toxic action of ACR in the context of raised hemato-neurotoxicity.

Keywords: Acrylamide, Zebrafish, hemato-neurotoxicity, adducts, hemoglobin, neuromastoms, melanophores, δ -aminolevulinic acid dehydratase, acetylcholinesterase.

TABLA DE CONTENIDO

Agradecimientos.....	iii
Resumen en español.....	v
Resumen en inglés.....	vi
Tabla de contenido.....	vii
Lista de Figuras.....	xi
Lista de Tablas.....	xiv
I Introducción.....	1
II Antecedentes.....	4
II.a. Acrilamida (ACR).....	4
II.a.1. Biosíntesis de la acrilamida.....	7
II.a.2. Toxicocinética de la acrilamida.....	8
II.a.3. Metabolismo de la acrilamida.....	9
II.a.4. Toxicidad de la acrilamida.....	10
II.b. Evidencia clínica.....	12
II.c. Evidencia experimental.....	14
II.d. El pez cebra (<i>Danio rerio</i>) como modelo experimental.....	18
II.e. Tejido hematopoyético.....	24
II.f. Sistema nervioso.....	29
II.g. Justificación de la Investigación.....	36
II.h. Hipótesis.....	36
II.i. Objetivos.....	37
II.i.1. Objetivo General.....	37
II.i.2. Objetivos Específicos.....	37
III Materiales y Métodos.....	38
III.a. Obtención de pez cebra adulto.....	38

III.a.1. Obtención de huevos y larvas del pez cebra.....	39
III.b. Dosificación de acrilamida en el modelo adulto del pez cebra y cálculo de la CL ₅₀	40
III.b.1. Dosificación de acrilamida en el modelo larvario del pez cebra y cálculo de la CL ₅₀	43
III.c. Extracción de la muestra de sangre del pez cebra adulto.....	44
III.d. Evaluación de la hematotoxicidad.....	45
III.d.1. Análisis de la morfología sanguínea del pez cebra adulto expuesto a la acrilamida.....	45
III.d.2. Evaluación de la hemoglobina (Hb) en la sangre del pez cebra adulto expuesto a la acrilamida.....	47
III.d.3. Evaluación de la actividad enzimática.....	48
III.d.3.1. Ácido δ -aminolevulínico dehidratasa en la sangre del pez cebra adulto expuesto a la acrilamida.....	48
III.d.3.2. Acetilcolinesterasa en la sangre del pez cebra adulto expuesto a la acrilamida.....	49
III.e. Evaluación de la neurotoxicidad.....	51
III.e.1. Evaluación de la actividad motora en el modelo de pez cebra adulto expuesto a la acrilamida.....	51
III.e.1.2. Evaluación de la actividad motora en el modelo larvario de pez cebra expuesto a la acrilamida.....	51
III.e.2. Evaluación de las estructuras sensoriales en el modelo larvario del pez cebra expuestos a la acrilamida.....	52
III.f. Evaluación histológica en el modelo larvario y del pez cebra adulto expuestos a la acrilamida.....	53
III.g. Estadística.....	58

IV Resultados.....	59
IV.a. Toxicidad de la acrilamida en pez cebra adulto.....	59
IV.a.1. Concentración letal media (CL ₅₀) de acrilamida en el modelo experimental de pez cebra adulto.....	59
IV.a.2. Variación del peso en peces cebra tratados con acrilamida.....	62
IV.a.3. Actividad motora en peces cebra expuestos a la acrilamida.....	63
IV.a.4. Morfología del tejido sanguíneo de peces cebra expuestos a la acrilamida.....	66
IV.a.5. Hemoglobina del pez cebra expuesto a la acrilamida.....	67
IV.a.6. Actividad de la enzima ácido δ -aminolevulínico deshidratasa (ALAD).....	68
IV.a.7. Actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE).....	68
IV.a.8. Estructuras sensoriales en el pez cebra expuesto a la acrilamida.....	71
IV.a.8.1. Efecto sobre los melanóforos.....	71
IV.a.9. Tejidos en pez cebra expuesto a la acrilamida.....	71
IV.b. Toxicidad de la acrilamida en larva de pez cebra.....	74
IV.b.1. Concentración letal media (CL ₅₀) de acrilamida en el modelo larvario de pez cebra.....	74
IV.b.2. Cambios morfológicos en larvas de pez cebra expuestas a la acrilamida.....	76
IV.b.3. Actividad motora en larvas de pez cebra expuestas a la acrilamida.....	76
IV.b.4. Actividad de la ácido δ -aminolevulínico deshidratasa (ALAD).....	78
IV.b.5. Estructuras sensoriales en larvas expuestas a la acrilamida.....	78
IV.b.5.1. Efecto sobre los melanóforos.....	79
IV.b.6. Actividad de las transaminasas (AST/ALT) en larvas expuestas a la acrilamida.....	80

V	Discusión.....	82
V.a.	Relación concentración-respuesta a la acrilamida.....	82
V.b.	Hematotoxicidad inducida por la acrilamida.....	87
V.c.	Neurotoxicidad inducida por la acrilamida.....	90
V.d.	Actividad de la ácido δ -aminolevulínico deshidratasa (ALAD) y de la acetilcolinesterasa (AChE).....	93
VI	Conclusiones.....	96
VII	Recomendaciones.....	97
VII	Referencias Bibliográficas.....	98

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de la Acrilamida (ACR). Monómero alqueno tipo 2.....	4
Figura 2. Mecanismo simplificado de formación de la acrilamida, a partir de azúcares reductores y compuestos dicarbonilos.....	7
Figura 3. Metabolismo de la acrilamida.....	9
Figura 4. Formación de los aductos entre la acrilamida y el grupo valina de la hemoglobina.....	10
Figura 5. Formación de los aductos entre la acrilamida y los residuos proteicos de cisteína.....	11
Figura 6. Formación de aductos: reacción de Michael.....	16
Figura 7. El pez cebra (<i>Danio rerio</i>).....	19
Figura 8. Esquema de los órganos del pez cebra. A: estadio larvario de 5 días post fertilización (dpf); B: pez adulto.....	21
Figura 9. Bazo del pez cebra adulto.....	24
Figura 10. Riñón del pez cebra adulto.....	25
Figura 11. Circulación sanguínea en la larva del pez cebra.....	25
Figura 12. Sangre periférica, células sanguíneas del pez cebra.....	26
Figura 13. Estructura de la molécula de hemoglobina humana.....	28
Figura 14. Biosíntesis de la hemoglobina.....	28
Figura 15. Plan básico de organización del sistema nervioso en los vertebrados.....	30
Figura 16. Cerebro del pez cebra adulto de 5 meses de edad.....	30
Figura 17. Esquema de la estructura del neuromastoma.....	31
Figura 18. Patrón de distribución de los neuromastomas craneales y troncales.....	31
Figura 19. Desarrollo del sistema de línea lateral posterior de pez cebra.....	32
Figura 20. Esquema del Melanóforo.....	33

Figura 21. Protocolo de incorporación de los peces al nuevo ambiente.....	39
Figura 22. Peceras para dosificación del pez cebra adulto.....	41
Figura 23. Placa de 24 pozos para dosificación.....	44
Figura 24. Extendido del frotis de sangre periférica.....	45
Figura 25. Relación entre el porcentaje de mortalidad en peces cebra adultos y la concentración de acrilamida.....	60
Figura 26. Relación del porcentaje de mortalidad de peces cebra adultos y la concentración de acrilamida en valores Probit.....	60
Figura 27. Gráfica de la relación del Peso (mg) vs. Tiempo (horas) durante 8 días de tratamiento con CL ₅₀ de acrilamida.....	63
Figura 28a. Plano de referencia del movimiento y la orientación de nado del pez control.....	64
Figura 28b. Análisis para determinar el área de desplazamiento y la velocidad de nado del pez control.....	64
Figura 29a. Plano de referencia del movimiento y la orientación de nado del pez tratado.....	65
Figura 29b. Análisis para determinar el área de desplazamiento y la velocidad de nado del pez tratado.....	65
Figura 30. Frotis de sangre periférica de peces controles y tratados.....	66
Figura 31. Bandas de Hemoglobina (Hb) de peces cebra controles y tratados con acrilamida.....	67
Figura 32. Representación gráfica de la densidad de las bandas de la hemoglobina de los peces controles versus la hemoglobina de los peces tratados.....	67
Figura 33. Curva de Calibración para la determinación de la actividad de la Acetilcolinesterasa.....	69
Figura 34. Efecto de la acrilamida sobre los melanóforos en el pez cebra adulto.....	71

Figura 35. Efectos de la acrilamida sobre el parénquima renal.....	72
Figura 36. Efectos de la acrilamida sobre el parénquima hepático.....	73
Figura 37. Efectos de la acrilamida sobre el tejido intestinal.....	74
Figura 38. Relación entre la concentración y el porcentaje de respuesta de la letalidad de acrilamida en larvas de pez cebra.....	75
Figura 39. Relación entre la concentración de acrilamida y el porcentaje de mortalidad en transformación Probit en larvas de pez cebra.....	75
Figura 40. Señales de la acción tóxica de la acrilamida en larvas de pez cebra.....	76
Figura 41. Registro del análisis del área de desplazamiento y velocidad de nado de la larva control y tratada con acrilamida.....	77
Figura 42. Daño inducido por la acrilamida sobre los neuromastomas.....	79
Figura 43. Melanóforos de larvas control y tratadas con acrilamida.....	80
Figura 44. Actividad enzimática de las transaminasas en larvas tratadas con la CL ₅₀ de acrilamida.....	81
Figura 45. Esquema de posible mecanismo de acción de la acrilamida sobre los neuromastomas en larvas de pez cebra.....	92
Figura 46. Esquema de las células ciliadas que muestra el desplazamiento de los cilios frente a distintos estímulos.....	92

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Contenido de ACR ($\mu\text{g}/\text{Kg}$ producto) en diferentes grupos de alimentos.....	6
Tabla II. Principales propuestas para la formación de acrilamida en los alimentos procesados.....	8
Tabla III. Impacto del pez cebra en biomedicina y biotecnología.....	23
Tabla IV. Relación entre el Probit empírico y el porcentaje de mortalidad.....	43
Tabla V. Datos para la construcción de la curva concentración-respuesta, Método Probit.....	59
Tabla VI. Datos para la determinación de la CL_{50} por el Método de Spearman-Kärber.....	61
Tabla VII. Lectura de Densidad Óptica a 555 nm para determinar la actividad de la enzima ALAD.....	68
Tabla VIII. Datos de la curva de calibración para la determinar la actividad de la enzima AChE.....	69

I INTRODUCCIÓN

El presente trabajo se enmarca dentro de la línea de investigación llevada a cabo en el Laboratorio de Microscopía del Instituto Anatómico “José Izquierdo”, cuyo objetivo general es el estudio de las señales de daño inducida por agentes químicos, fármacos o contaminantes sobre los distintos órganos, tejidos y células que conforman las unidades morfo-funcionales en los vertebrados superiores e inferiores. Estas señales, y en particular el daño inducido sobre unidades morfo-funcionales, tales como el sistema hematopoyético y los órganos sensoriales, constituyen la base para las respuestas de los organismos a diversos estímulos procedentes tanto del medio ambiente como del medio interior.

Ia. Unidades Morfo-funcionales

Ia.1 Sistema Hematopoyético

El sistema hematopoyético como unidad morfo-funcional, se encuentra constituido por la médula ósea y las células sanguíneas, particularmente los eritrocitos, en mayor proporción. En todos los organismos vertebrados superiores e inferiores, el sistema hematopoyético garantiza, tanto en las etapas embrionarias como en la adultez, el establecimiento de la homeóstasis o el equilibrio dinámico interno para la adaptación y sobrevivencia ⁽¹⁾. Esta unidad morfo-funcional, tomando como ejemplo los peces, vertebrados constantemente sometidos a la agresión ambiental, es altamente sensible a los estresores químicos o metabólicos, por lo que la morfología de las células sanguíneas, a nivel de sangre periférica, entre otras características, podría constituir un indicador sensible y exacto de la actividad o cambio en la homeóstasis del sistema

hematopoyético ^(2,3). Esta característica ha permitido evaluar la sensibilidad de ésta denominada unidad morfo-funcional ante la acción de contaminantes ambientales y otros agentes tóxicos, así como obtener información significativa en el diagnóstico e interpretación de las diversas hematopatologías.

Ia.2 Órganos Sensoriales

Los órganos del sistema sensorial, como unidad morfo-funcional, se fundamentan en estructuras receptoras, capaces de reconocer los estímulos, procesarlos y transmitirlos. En vertebrados como los peces, entre otras estructuras u órganos sensoriales, se encuentra la conocida línea lateral; constituida por unidades estructurales denominadas neuromastomas. Los neuromastomas, son un conjunto de células neuronales sensitivas, con comunicaciones sinápticas que permiten la integración estímulo-respuesta a nivel del Sistema Nervioso y, que a nivel embrionario se encuentran expuestas al medio ambiente siendo de fácil observación, mientras que en el adulto se encuentran internalizados ^(4,5). Esta característica a nivel embrionario, los convierte en estructuras blancas a la acción de distintas señales ambientales, entre ellas las provenientes de agentes químicos y contaminantes en general. Otras estructuras sensibles, en estos vertebrados, son los melanóforos los cuales son células especializadas en el transporte de los melanosomas contentivos de eumelanina que favorece el camuflaje de los peces al permitir el cambio del color de la piel; la regulación funcional de los melanóforos, tanto en adultos como en estadios embrionarios a través del sistema nervioso y de estructuras del citoesqueleto ^(6,7), respectivamente, lo convierten en un potencial blanco de respuesta a la acción de diferentes agentes tóxicos.

Cabe destacar que como en todo organismo vivo las denominadas unidades morfo-funcionales, se encuentran en constante interacción fisiológica, lo que aunado a su sensibilidad ante todo tipo de estímulo ambiental, hace pertinente la propuesta de estudiar la respuesta hemato-neurológica, para evaluar señales de daño inducida por un agente químico contaminante como es la Acrilamida (ACR), un monómero de alqueno tipo 2, que en los últimos años ha adquirido gran interés por parte de numerosos investigadores a nivel mundial ^(8,9,10).

II ANTECEDENTES

II.a. Acrilamida

Dentro de los agentes químicos que han cobrado gran interés en las últimas décadas, se encuentra la Acrilamida (ACR) (Fig. 1). La ACR es un monómero de alqueno tipo 2, presentado como un polvo blanco cristalino, altamente soluble en agua así como en una variedad de solventes orgánicos a saber: etanol, metanol, dimetiléter y acetona; siendo insoluble en benceno y heptano ⁽¹¹⁾. También es conocida como etilencarboxamida, vinyl-amida, 2-propenamida. Su fórmula molecular es: $\text{CH}_2\text{CHCONH}_2$. Dentro de las propiedades físico-químicas de este agente tóxico se describen: aspecto sólido, blanco, inodoro, peso molecular 71,08 g/mol, pH 5,5–7,5, densidad 1,12 g/mL, punto de ebullición 125 °C, punto de fusión 87,5 °C, punto de inflamación 138°C, temperatura de autoignición 424 °C ⁽¹¹⁾.

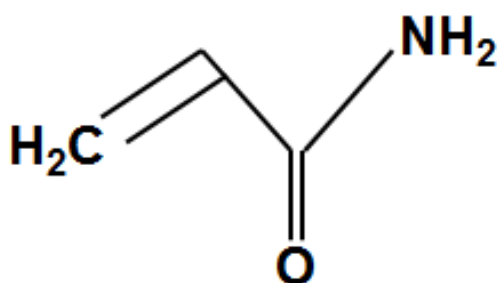


Fig. 1. Estructura química de la Acrilamida (ACR). Monómero alqueno tipo 2 ⁽¹²⁾.

La exposición a la ACR, por parte de los organismos biológicos, tanto humanos como animales, ha sido considerada un problema de contaminación en ambientes industrializados, debido a la presencia en altas cantidades de este agente químico ⁽¹³⁾.

Su presencia en productos de uso comercial, tales como cosméticos, pinturas, pegamentos, telas, lentes de contacto, azúcar refinada, geles para cromatografía o electroforesis, así como su presencia en el humo de los cigarrillos y en los gases liberados por el tubo de escape de los automóviles, ha contribuido al desarrollo de este problema de contaminación con la ACR ^(9,14).

En las últimas décadas, esta problemática se ha agudizado debido a que la presencia de la ACR ha sido identificada en productos alimentarios de consumo masivo (Tabla I). El contenido de ACR, en diferentes grupos de alimentos, se orienta hacia aquellos que poseen una gran cantidad de carbohidratos y pocas proteínas. Entre estos alimentos se encuentran los cereales, pastas, café, pan tostado, galletas que son preparados a elevadas temperaturas, generalmente por encima de los 120 °C; tal como se ha descrito durante procedimientos culinarios como el tratamiento térmico de esterilización, fritura, tostado, horneado o grill, a fin de mejorar las propiedades organolépticas de los alimentos ^(15,16). Adicionalmente, se ha referido que el contenido de azúcares reductores en estos alimentos se correlaciona fuertemente con la formación o biosíntesis de la ACR ⁽¹⁶⁾. Un primer punto de formación de la ACR, es la superficie del alimento, donde se alcanzan con mayor rapidez las temperaturas a partir de las cuales se forma este agente tóxico. El interior de los alimentos no alcanza altas temperaturas porque el tiempo de cocción no es tan prolongado para ello ⁽¹⁷⁾. Algunos investigadores, han confirmado que tras la cocción de una gran variedad de alimentos a estas temperaturas, se favorece la reacción de Maillard, la cual es un proceso no enzimático, que genera compuestos que aumentan el sabor y olor de los alimentos. El calentamiento de cantidades equimolares de asparagina y glucosa, a 180 °C durante 30 minutos

produce 368 μmol de ACR por mol de asparagina ⁽¹⁸⁾. La interacción entre aminoácidos, principalmente asparagina (fuente de nitrógeno) y azúcares reductores (fuente de grupo carbonilo), lleva a la formación de una base de Schiff, la cual puede reaccionar mediante distintos mecanismos hasta formarse la ACR ⁽¹⁶⁾. Por esta característica, este compuesto tóxico es considerado un contaminante químico de procesado ⁽¹⁵⁾.

Tabla I. Contenido de ACR ($\mu\text{g}/\text{Kg}$ producto) en diferentes grupos de alimentos.

ALIMENTO	CONTENIDO (μg)	MÁXIMO REPORTADO (μg)	N
CEREALES Y DERIVADOS			
Productos procesados a base de cereales	366	7834	2991
Panes y rollos dulces	446	3436	1294
Pasteles y galletas	350	7834	1270
Cereales para desayuno	96	1346	369
Pizza	33	763	58
RAÍCES Y TURBÉRCULOS			
Papa asada	169	1270	22
Papas fritas (industrial)	752	4080	874
Papas fritas (no industrial)	334	5312	1097
ESTIMULANTES Y ANÁLOGOS			
Café (molido, tostado o instantáneo, no infusión)	288	1291	205
Extractos de café	1100	4948	20
Café descafeinado	668	5399	26
Sustitutos de café	845	7300	73
Té verde (tostado)	306	660	29
ALIMENTOS INFANTILES			
Fórmulas infantiles	< 5	15	82
Alimentos enlatados, embotellados	22	121	96
Alimentos en polvo seco	16	73	24
Alimentos galletas, bizcochos	181	1217	32

Fuente: Elika, 2005, modificado por Hernández C, 2013 ⁽⁸⁾. N=número de muestras analizadas.

Esta amplia distribución del monómero de ACR, lo convierte en un agente ubicuo en problemas de contaminación ambiental y, por ende, en un agente con alta posibilidad de incorporación a los seres humanos.

II.a.1. Biosíntesis de la Acrilamida

El paso clave en la biosíntesis de ACR, es la descarboxilación de la base de Schiff (Fig. 2), reacción que usualmente se produce en medio acuoso. Dicha reacción, da origen a intermediarios tipo iminas, que pueden liberar directamente ACR o de manera indirecta a través de la acción de su precursor, 3-aminopropionamida ⁽¹⁹⁾.

Además, se han propuestos otras rutas de síntesis para tratar de explicar la formación de ACR (Tabla II).

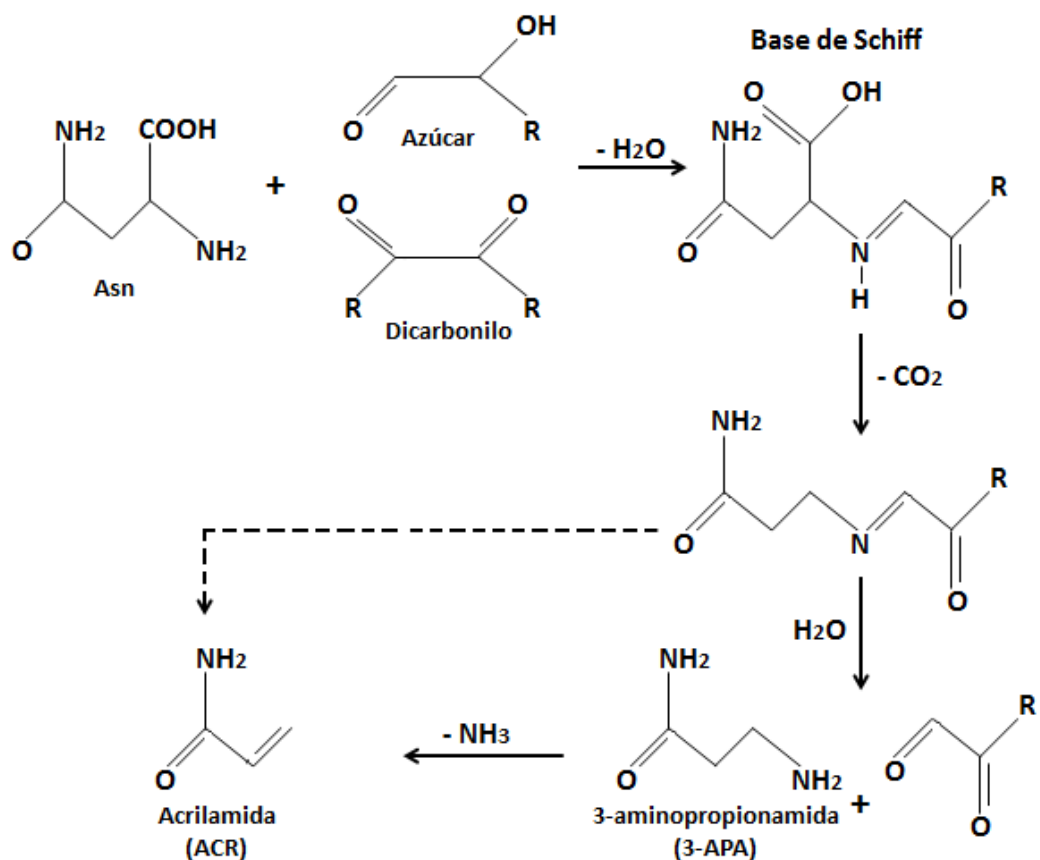


Fig. 2. Mecanismo simplificado de formación de la acrilamida, a partir de azúcares reductores y compuestos dicarbonilos ⁽¹⁹⁾. Interacción entre aminoácidos, principalmente la asparagina (Asn) y azúcares reductores (fuente de grupo carbonilo), lleva a la formación por deshidratación de una base de Schiff. Esta última sufre una descarboxilación para formar un intermediario tipo imina que reacciona mediante distintos mecanismos hasta formarse la ACR.

Tabla II. Principales propuestas para la formación de acrilamida en los alimentos procesados.

MECANISMOS PROPUESTOS	REFERENCIA
Descarboxilación de la base de Schiff vía el intermediario oxazolidin-5-ona, tautomerización al producto descarboxilado de Amadori y posterior β -eliminación.	Yaylayan y col., 2003
Descarboxilación de la base de Schiff y el anclaje heterocíclico del compuesto de tipo imina.	Zyzak y col., 2003
Descarboxilación de la base de Schiff, luego mediante hidrólisis de la imina, se forma el 3-APA y posterior desaminación.	Zyzak y col., 2003
Acido acrílico + NH_3	Stadler y col., 2003
Acroleína + asparagina / acroleína + NH_3 / ácido acrílico + NH_3	Yasuhata y col., 2003
Ácido acrílico + 2-propenal \rightarrow reacción con NH_3	Vattem y Shetty, 2003.

Fuente: Morales y col., 2008⁽¹⁹⁾.

II.a.2. Toxicocinética de la Acrilamida

Como es bien sabido, la toxicocinética involucra el conjunto de modificaciones que sufre un tóxico dentro del organismo. Hasta el presente, se han descrito diversas formas de exposición a los monómeros de ACR, estando catalogadas como las de mayor relevancia la vía respiratoria, la vía dérmica y la vía oral^(10,20).

Cabe destacar que en los humanos la incorporación de la ACR en el organismo puede ocurrir a través de diferentes vías, aunque los datos sobre la biodisponibilidad a partir de matrices de alimentos son limitados, la absorción se considera que es rápida y completa por la vía oral en todas las especies^(10,16). Cabe resaltar que el metabolismo de la ACR ocurre principalmente a nivel hepático, con la consecuente producción de un epóxido altamente reactivo como es la glicidamida (GA)^(21,22). Debido a la elevada solubilidad en agua, tanto de la ACR como de la GA, presentan una amplia distribución

en todos los tejidos corporales, incluso en la placenta ⁽¹⁰⁾. Igualmente, la presencia de ambos compuestos ha sido descrita en la leche materna ⁽⁹⁾.

II.a.3. Metabolismo de la Acrilamida

Respecto al metabolismo de la ACR (Fig. 3), se puede destacar que éste se fundamenta en dos mecanismos principales: 1) Oxidación, mediante la acción del CYP 2E1, lo cual da origen a la glicidamida (GA), que posterior a un proceso de hidrólisis se transforma en gliceramida un compuesto no tóxico; y 2) Conjugación con el glutatión, la cual es catalizada por la glutatión-S-transferasa (GST). Los conjugados con glutatión, se excretan como derivados N-acetil-S-(3-amino-2-hidroxi-3-oxopropil)-cisteína y N-acetil-S-(carbamoil-2-hidroxi-etil)-cisteína en la orina ^(20,23).

Hasta el momento, todos los metabolitos conocidos derivados de la ACR, han sido asociados con tiempos de vida media de eliminación relativamente cortos ⁽¹⁷⁾.

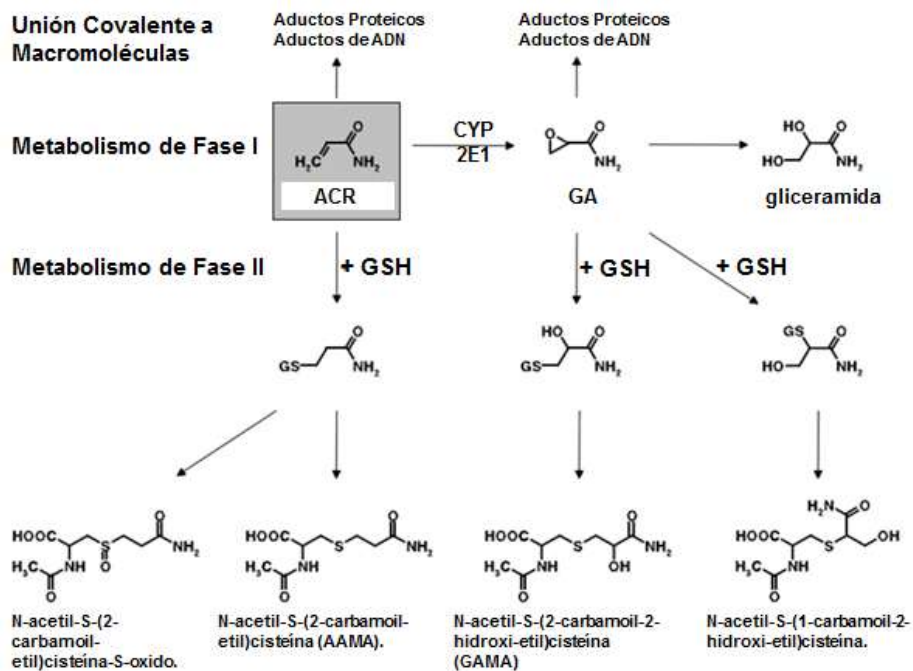


Fig.3 Metabolismo de la acrilamida. Fuente: Fuhr y col., 2006, modificado por Hernández C., 2013 ⁽²⁴⁾.

II.a.4. Toxicidad de la Acrilamida

Por sus características físico-químicas, ha sido considerado un agente carcinogénico categoría 2, hematotóxico y neurotóxico, según la Unión Europea (UE) y la Agencia Internacional para las Investigaciones contra el Cáncer (IARC) ⁽¹⁷⁾.

La naturaleza hidrofílica de la ACR ha permitido sugerir la posibilidad de formación de diversos aductos, entre ellos los aductos con la hemoglobina (Hb). Esta importante molécula transportadora de oxígeno, por las características de su estructura terciaria, es susceptible de reaccionar con la ACR y con su principal metabolito como es la glicidamida (GA), originando los denominados aductos hematotóxicos tales como los formados con residuos N-terminal de valina de la Hb (Fig.4). Este derivado ha sido utilizado como un biomarcador de una de las primeras vías de acción tóxica de la ACR ⁽²⁵⁾, con lo cual se podría inferir un posible compromiso morfo-funcional del sistema hematopoyético.

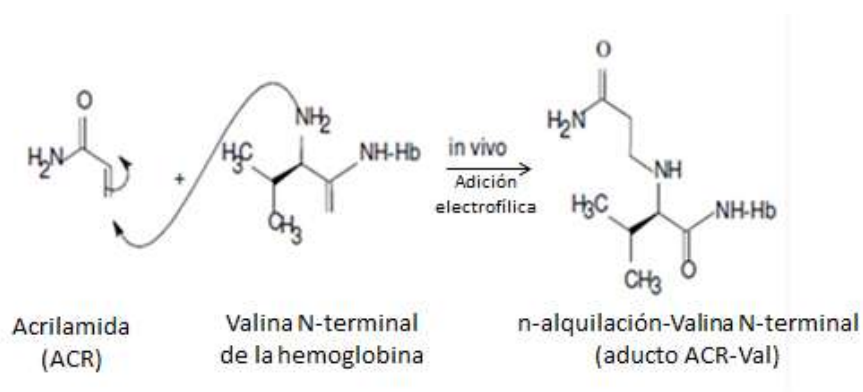


Fig. 4. Formación de los aductos entre la acrilamida y el grupo valina de la hemoglobina ⁽²⁶⁾.

Otros de estos aductos son los neurotóxicos, formados a través de la reacción de la ACR con los residuos de cisteína de las proteínas (Fig. 5), y los aductos

fomentar la investigación acerca de la toxicidad y el efecto sobre la salud, vinculada con la exposición a este importante agente tóxico ^(10,14). Evidencias clínicas y experimentales han enfatizado sobre ello.

II.b. Evidencia Clínica

La mayoría de la evidencia clínica de la intoxicación por la ACR, proviene de la exposición a nivel ocupacional reportada desde hace décadas. Ejemplo de ello son los casos reportados en los trabajadores de la industria de la construcción, la explotación minera y fábricas donde se describen a estos trabajadores con afecciones tales como prurito, descamación de la piel, aumento en la sudoración, entumecimiento de las manos y los pies, debilidad muscular, pérdida de la sensibilidad, marcha atáxica además de dermatitis de contacto luego de la exposición aguda a la ACR ^(30,31). Los reportes concluyen, que los espacios pobremente ventilados como túneles y minas favorecen principalmente la vía inhalatoria, como puerta de entrada de este agente tóxico al organismo ^(13,31). Particularmente, se ha descrito el desarrollo de toxicidad a nivel de sistema nervioso (SN) como principal efecto adverso asociado con la exposición a éste agente químico, generándose disfunciones de tipo neuropatía periférica, tanto en humanos como en animales experimentales ⁽³²⁾.

Otros reportes de exposición ocupacional han enfocado la formación de aductos de la Hb en grupos de trabajadores que manipulan productos sellados que contienen ACR y N-metilacrilamida. En estos trabajadores, se ha determinado niveles del aducto ACR-Hb de 0,3 nmol/g globina; siendo una concentración cercana al nivel de ACR en el cual las personas expuestas han presentado síntomas de alteraciones leves y reversibles

del sistema nervioso periférico. Por otra parte, trabajadores con síntomas neurotóxicos francos, cuya labor está dirigida a manipular estructuras de hormigón (material de construcción), con un producto de sellado a base de ACR se determinó la concentración de los aductos ACR-Hb en niveles extremadamente altos, particularmente de 23 nmol/g globina (valor de referencia 0,02-0,07 nmol/g globina). Este elevado nivel de aductos ACR-Hb, ha sido asociado con una ingesta diaria de 0,8 mg de acrilamida/Kg de peso corporal. Esta asociación de la ingesta diaria de ACR, propuesta por la OMS, ha conducido a establecer que las dosis corporales por encima de 0,5 mg/kg de peso, comprometen la neurofuncionalidad. Por encima de esta dosis resulta evidente el desarrollo de neuropatía en humanos, independientemente que la vía de absorción sea inhalatoria, dérmica o por ingestión, estimado cuantitativamente a través de la formación de los aductos ACR-Hb ⁽³⁰⁾.

Otro estudio realizado en humanos sanos expuestos a la ACR a través de la dieta, ha evidenciado, que el tiempo de vida media de eliminación ($t_{1/2}$) de la ACR es variable entre 2,2 a 7 horas. Estos resultados se han atribuido a la variabilidad entre los individuos en cuanto a la biodisponibilidad y al metabolismo de la ACR. Igualmente, se ha reportado que la ACR ingerida en la dieta por una mujer embarazada, entre el 10 y el 50% pasa al feto a través de la placenta ^(25,33).

En los humanos, no existe evidencia que demuestre la formación de tumores por exposición aguda o crónica a la ACR ⁽³⁴⁾.

Otra evidencia clínica, haciendo uso de la sangre periférica de humanos, ha demostrado toxicidad diferencial entre la ACR y su principal derivado activo, la GA ⁽²⁶⁾.

Así, incubando la sangre humana con ACR en un intervalo de concentración entre 0,3 a 30 μmol , durante un tiempo de exposición de 1 a 6 horas; paralelamente se incubó la sangre humana con la GA con un rango de concentración, entre 0,3 a 10 μmol por durante 4 horas. Los investigadores refirieron que a una concentración de 3 μmol de ACR durante 1 hora de exposición, la producción de aductos con Hb fue mayor que al exponer la sangre a la GA en igual concentración durante 4 horas. En ese sentido, la comparación del efecto de la ACR y de su principal derivado sobre la sangre humana, ha permitido sugerir que la GA reacciona más lentamente con la Hb en la formación de aductos ⁽²⁶⁾.

Respecto a la farmacocinética de este agente contaminante en los seres humanos se conoce poco. Sin embargo, en un estudio realizado con voluntarios humanos el 34% de la dosis oral administrada, se detectó en la orina durante las primeras 24 horas ⁽¹⁷⁾.

II.c. Evidencia Experimental

Poca ha sido la evidencia experimental, asociada al efecto hematotóxico de la ACR, en comparación a los efectos neurotóxicos de la misma. Sin embargo, a nivel hematológico, la formación de aductos con la Hb, ha sido expresada como toxicidad diferencial entre la ACR y su principal derivado activo, la GA. Dicha diferenciación ha sido planteada, dependiendo de las vías de administración de la ACR, ya que la relación entre los aductos GA-Hb/ACR-Hb es mayor cuando la ingestión es oral, en contraste con la incorporación por vía dérmica. Esto ha vinculado la mayor biodisponibilidad de la GA con sus efectos tóxicos en ratas experimentalmente expuestas a la ACR ⁽²¹⁾.

A nivel neurotóxico, cabe destacar que en modelos animales *in vivo*, como son ratas, gallinas, ranas y peces de colores, se ha evaluado la neuropatía inducida tanto por la ACR como por compuestos análogos, tales como N-hidroximetilacrilamida, N-metilacrilamida y N,N-dietilacrilamida. Dichos análogos, se han mostrado menos potentes que la ACR en cuanto a la generación de neuropatía periférica, al ser administrados en altas dosis por períodos de tiempo prolongados ⁽³⁵⁾.

Otras evaluaciones *in vitro* han reportado toxicidad en los sinaptosomas estriatales y en las vesículas sinápticas del cerebro de ratas inducida por compuestos alquenos tipo 2, similares a la ACR, tales como la acroleína y N-etilmaleimida. Dicha toxicidad ha sido atribuida a una reducción de los grupos sulfhidrilos libres en los sinaptosomas expuestos a la ACR y a otros análogos de alquenos tipo 2 ⁽³⁶⁾.

Estos hallazgos, han confirmado la hipótesis de que los mecanismos de neurotoxicidad por la ACR y compuestos similares involucran la formación de aductos de Michael (Fig.6) con los grupos sulfhidrilos de estructuras proteicas que participan en una variedad de procesos pre-sinápticos como la neurotransmisión, endocitosis, metabolismo celular, producción de energía, transporte de membrana de iones y la arquitectura del citoesqueleto ⁽³⁴⁾. Cabe destacar que la oxidación de los grupos sulfhidrilos por acción de la ACR induce estrés oxidativo neuronal, lo que pudiese conllevar a la apoptosis celular ⁽³⁶⁾.

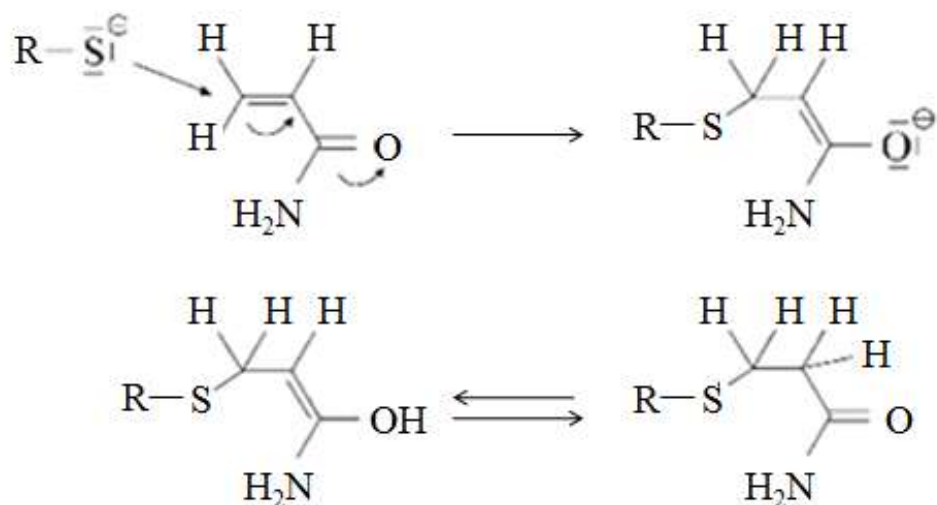


Fig. 6. Formación de aductos: reacción de Michael ⁽³³⁾.

Otro grupo de investigadores, al realizar estudios sobre los efectos neuroconductuales y transcripcionales de la ACR en ratas jóvenes tratadas con este compuesto han mostrado, efectos neurotóxicos similares a los reportados en ratas adultas. Estos autores, han indicado una pérdida progresiva en la ganancia de peso corporal, así como una disminución de la fuerza de agarre en las extremidades posteriores, acompañada de una disminución significativa lo que sugiere la afección de genes vinculados con la actividad motora. En tal sentido, los efectos sobre la transcripción revelaron una reducción significativa en la expresión de algunos genes involucrados en la diferenciación neuronal, la regulación de los procesos metabólicos de dopamina (Nr4a1, Nr4a2 y Nr4a3), la contracción muscular rápida (My11 y My1pf) y la señalización del dolor. Otro grupo de genes inductores de la síntesis de receptores opioides en tejido del nervio ciático ha mostrado igualmente una reducción significativa en sus respectivas rutas transcripcionales ⁽³⁷⁾.

Otro modelo experimental, particularmente el pez cebra, también ha sido empleado en los estudios de acción tóxica de la ACR. Ensayos in vivo, realizados durante el desarrollo del pez cebra incubado con ACR, ha mostrado que el desarrollo embrionario normal podría ser alterado así como la reducción de la actividad inmunológica de las larvas por la inhibición de la absorción de nutrientes y otras sustancias necesarias. Dicho efecto ha sido vinculado con la alta hidrofiliidad de la ACR; luego de 8 horas de exposición de los embriones, aproximadamente el 70% de la ACR es acumulada en la membrana externa y sólo un 0,3% ha sido encontrado en el citoplasma. Dentro de los efectos de la ACR evaluados en las larvas del pez cebra, de 7 días post fecundación (7 dpf), se ha reportado la presencia de edema del saco vitelino, malformación axial grave y la deficiencia en la vejiga natatoria ⁽³⁸⁾.

El mismo modelo de pez cebra, ha sido eficiente en la identificación de la toxicidad a nivel del sistema nervioso inducida por numerosos compuestos con acción neurotóxica, confirmada en los seres humanos. Además de la ACR, se ha ensayado el etanol, la 6-hidroxidopamina, el taxol, el ácido L-2 hidroxiglutarico, la neomicina, entre otros. Con la excepción del taxol, que se ha sido administrado, por microinyección directa en los embriones del pez cebra, todos estos compuestos han sido colocados en el agua de la pecera en el caso de las larvas ⁽³⁹⁾. Los agentes químicos ensayados inducen neurotoxicidad similar a la descrita en los humanos. Así, el etanol produjo alteraciones en el nervio óptico, en las neuronas motoras y en la proliferación neuronal. Por otra parte, la 6-hidroxidopamina indujo una significativa pérdida neuronal, la ACR generó desmielinización axonal tanto a nivel central como periférico y el taxol produjo apoptosis neuronal, entre otros efectos tóxicos. Con estos bioensayos se ha demostrado

que el pez cebra es susceptible a varias neurotoxinas, de manera similar a los humanos y otros mamíferos. Estos hallazgos apoyan el uso del pez cebra como un modelo predictivo para evaluar la neurotoxicidad de diversos compuestos ⁽³⁹⁾. Sin embargo, hasta el presente, en este modelo de pez cebra no se ha establecido claramente la hematotoxicidad por estos compuestos neurotóxicos.

Todas estas evidencias tanto clínicas como experimentales, *in vivo e in vitro*, que han expresado la acción tóxica de la ACR, incluyendo aquellas que la clasifican como un agente probablemente carcinogénico ⁽⁴⁰⁾, reflejan la vigencia de la toxicidad de la ACR y sus derivados tanto a nivel de la hematotoxicidad como a nivel de la neurotoxicidad. Sin embargo, el daño sobre la morfología del glóbulo rojo, la alteración de estructuras sensoriales sensibles a la acción tóxica de este agente contaminante, así como las características funcionales, tisulares y celulares posiblemente vinculadas con la intoxicación por la ACR, no han sido claramente descritas.

En tal sentido, en la presente investigación se ha propuesto evaluar la toxicidad hemato-neurológica en un novel modelo experimental que presenta alta similitud con el genoma humano, como lo es el pez cebra (*Danio rerio*), en sus estadios adulto y larvario con el fin de aportar información que contribuya a la comprensión de las señales de daño morfo-funcional, tanto a nivel del sistema hematopoyético como a nivel de las estructuras sensoriales posiblemente relacionadas con la intoxicación por la ACR.

II.d. El pez cebra (*Danio rerio*) como modelo experimental

El pez cebra (*Danio rerio*) (Fig. 7), es un pequeño pez actinopterigio del Superorden *Teleostei*, Orden *Cypriniformes* y Familia *Cyprinidae*. Es originario de

aguas dulces del sureste asiático, mide entre 3 y 5 cm de longitud en la edad adulta, presentan dimorfismo sexual, siendo las hembras las de mayor tamaño. Se caracterizan por ser alargados, fusiformes, de color dorado o plateado, presentan una aleta dorsal única; longitudinalmente poseen de 5 a 9 bandas de color azul oscuro, dándole un aspecto cebrado, al cual se debe su nombre ⁽⁴¹⁾.



Fig. 7. El Pez Cebra (*Danio rerio*) ⁽⁴¹⁾.

En las últimas décadas, ha habido un interés creciente por el organismo vertebrado pez cebra (*Danio rerio*) como herramienta para estudiar la enfermedad humana. En el pez cebra, se ha mapeado totalmente su genoma, lo que ha permitido evidenciar una alta similitud con el genoma humano, incluyendo las regiones no codificantes. Ello ha permitido sugerir que numerosos genes implicados en las enfermedades humanas podrían ser comparados en el genoma del pez cebra ⁽⁴²⁾.

En estudios de mutagénesis, el pez cebra ofrece múltiples ventajas debido a que por su pequeño tamaño se hace viable mantener en un espacio razonable la cantidad de líneas necesarias para realizar cruces y a sus mutantes resultantes ⁽⁴³⁾. Así, el corto tiempo de generación de un pez adulto, aproximadamente de tres meses, determina que transcurra menos de un año entre el proceso de mutagénesis y la obtención de individuos homocigotos. Igualmente, la puesta de cientos de huevos y el desarrollo externo de los

mismos facilita el análisis genético. En los últimos diez años, en el pez cebra se han encontrado más de mil mutaciones que afectan el desarrollo y/o funcionamiento de órganos ⁽⁴⁴⁾.

Las características de este modelo experimental, como son la embriogénesis externa y la transparencia de los embriones permiten observar en el microscopio todos los estadios de su desarrollo. La organogénesis del pez cebra es rápida, a las 24 horas post-fecundación (24 hpf), se aprecia la segmentación del cerebro y la formación de estructuras como el tubo neural, la notocorda precursor del músculo y los somitos precursores del esqueleto. Para los 5 días post-fecundación (5 dpf), se pueden observar al microscopio las estructuras de los órganos internos totalmente desarrollados o en desarrollo como el corazón, el hígado, los riñones y el páncreas, además se han formado órganos sensoriales como los ojos y los oídos, siendo fácilmente comparables con los órganos en el estadio adulto (Fig. 8) ⁽⁴⁵⁾. Asimismo, los sistemas circulatorio, digestivo y nervioso son perfectamente funcionales. En este momento el pez es totalmente capaz de responder a estímulos visuales, olfativos y mecánicos ⁽⁴⁶⁾, lo que hace eficiente al pez cebra en los estudios de toxicidad de sustancias que son absorbidas del medio en que se los mantiene ⁽⁴⁷⁾.

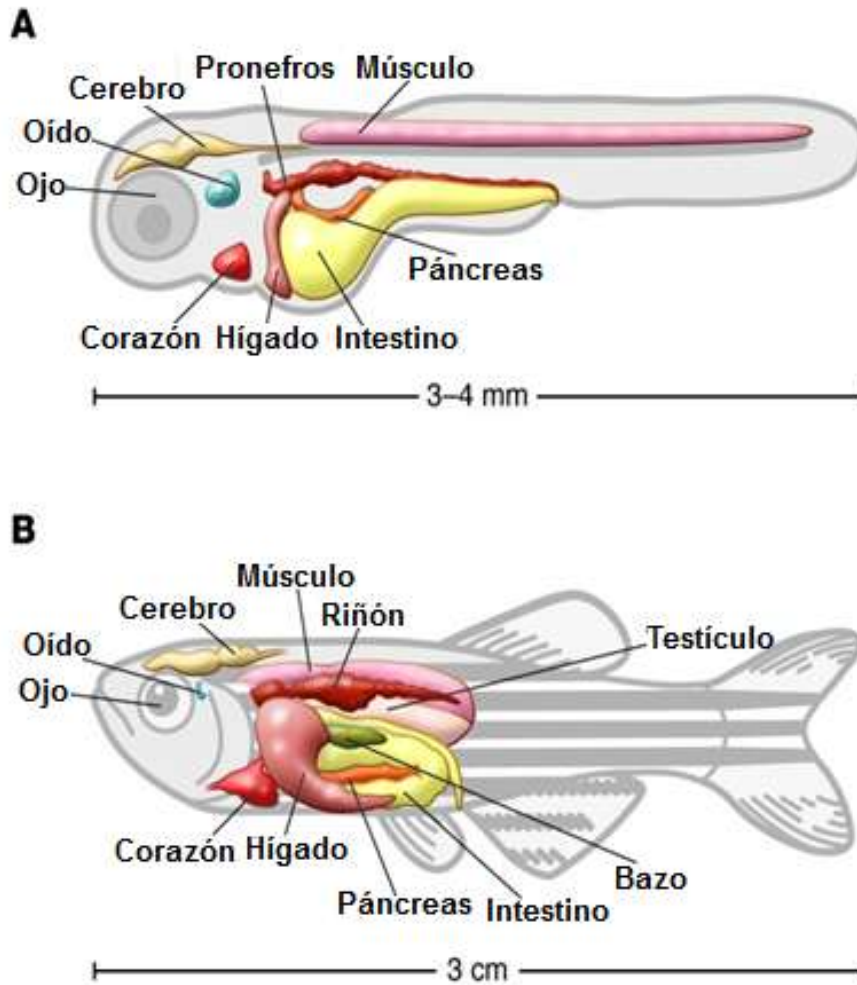


Fig. 8. Esquema de los órganos del pez cebra. **A:** estadio larvario de 5 días post fertilización (dpf); **B:** pez adulto ⁽⁴⁵⁾.

El mantenimiento del pez cebra es de bajo costo, tienen alta fertilidad, se reproducen durante todo el año, corto tiempo de generación, y al ser un vertebrado muestra gran correlación con los modelos de mamíferos ⁽⁴⁸⁾. Dentro de las similitudes están el tipo de proteínas utilizadas en el desarrollo de diferentes órganos y tejidos, los mecanismos para el desarrollo de organismos adultos, así como procesos que determinan el envejecimiento y la muerte ⁽⁴⁴⁾.

Este biomodelo, asociado a la posibilidad de evaluar el efecto de numerosos compuestos químicos con potencial terapéutico o tóxico, ha marcado el nacimiento de una nueva etapa en el área de la biomedicina (Tabla III) ⁽⁴⁴⁾. Entre las principales ventajas para el uso del pez cebra como modelo experimental están las siguientes ⁽⁴⁷⁾:

.- Se trabaja con todo el genoma de un organismo completo, aportando más y mejor información que los modelos celulares.

.- Permite la obtención de resultados más rápidamente y es menos costoso que trabajar con roedores.

.- Reconocidos organismos internacionales como la EPA (Agencia de Protección Medioambiental de los EEUU) y la OCDE (Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico), han considerado el modelo de pez cebra como una de las mejores alternativas para investigar los efectos de compuestos tóxicos en el medio ambiente.

.- Además de la tolerancia al dimetilsulfóxido (DMSO) al 1%, el pez cebra tiene la capacidad de absorber compuestos directamente desde el agua; en el caso de compuestos de muy baja solubilidad, se pueden administrar por microinyección.

.- Satisface el criterio de las 3 Rs (Reducir, Refinar y Reemplazar).

.- Se requiere menor cantidad del compuesto a analizar, comparado con otros modelos de vertebrados.

Tabla III. Impacto del Pez cebra en Biomedicina y Biotecnología.

CAMPO DE APLICACIÓN	EJEMPLO	COMENTARIO/ DIANA
Desarrollo de Nuevos Fármacos		
Descubrimiento	Control de arritmia severa	Ortólogo de HERG
Mecanismo de Acción	Angiogénesis	Metioninaaminopeptidasa
Metabolismo y excreción	Metabolismo de pequeñas moléculas	
Farmacodinamia y farmacocinética	Rutas de absorción	Genérico
Modelos de Enfermedad		
Cáncer	Leucemia Metástasis	c-myc
Cardiovascular	Insuficiencia circulatoria	Syndecan-2
Trastornos del comportamiento	Alteraciones del sueño y drogodependencias	Receptores de opiáceos
Enfermedades poco frecuentes (raras)	Síndrome de DiGeorge Anemia de Fanconi Atrofia muscular espinal	Mutación Van Gogh (tbx1) FANCD2 Smn
Toxicogenómica		
Contaminación ambiental	Evaluación de la calidad del agua Cadmio	Genérico HSp70
Piscicultura		
Estudio de patogénesis	Infecciones bacterianas y víricas	Estreptococo y Salmonella
Desarrollo de vacunas	Vacunas antivíricas	Virus con cápside
Biorreactores	Producción de proteínas de interés biomédico	FVII Genérico

Fuente: Rojas-Muñoz y col., 2007, modificado por Hernández C, 2013⁽⁴⁴⁾. HERG: Gen Eag relacionado a humanos; c-myc: gen regulador del factor de transcripción, pro-oncogén; Syndecan-2: proteína integral de membrana; tbx1: factor de transcripción; FANCD2: anemia de Fanconi, grupo de complementación D2; Smn: gen que ayuda a la supervivencia de las neuronas motoras; HSp70: proteínas de shock térmico de 70 KDa; FVII: gen que codifica al factor VII de coagulación.

Adicionalmente a todas estas características el modelo experimental propuesto presenta unidades morfo-funcionales de fácil acceso y manipulación. Particularmente, su sistema hematopoyético así como las características de su sistema nervioso posibilitan el estudio de alteraciones hemáticas y el estudio de la acción de diversos agentes neurotóxicos, respectivamente, de manera similar a los estudios realizados en mamíferos.

II.e. Tejido Hematopoyético

El sistema hematopoyético en los mamíferos está formado por órganos y tejidos involucrados en la proliferación, maduración y destrucción de las células sanguíneas. La principal fuente del tejido hematopoyético se ubica en el hueso, específicamente en la cavidad de la médula ósea, a partir de la cual se sintetizan los diferentes elementos celulares de la sangre ⁽⁴⁹⁾. El adecuado funcionamiento de este sistema hematopoyético asegura la producción de las células responsables del transporte de oxígeno, de la coagulación sanguínea y de la inmunidad tales como los eritrocitos, las plaquetas y los leucocitos, respectivamente ⁽¹⁾.

A diferencia de los mamíferos, la principal fuente del tejido hematopoyético del pez cebra se encuentra ubicada en dos órganos, como lo son el bazo y el riñón, específicamente, en la pulpa roja del bazo (Fig. 9) y en el intersticio renal (Fig. 10). Las células madres hematopoyéticas del pez cebra, se ubican en el estroma del tejido retículo endotelial, de manera similar a como se ubican estos precursores en la médula ósea de los mamíferos ⁽⁵⁰⁾.

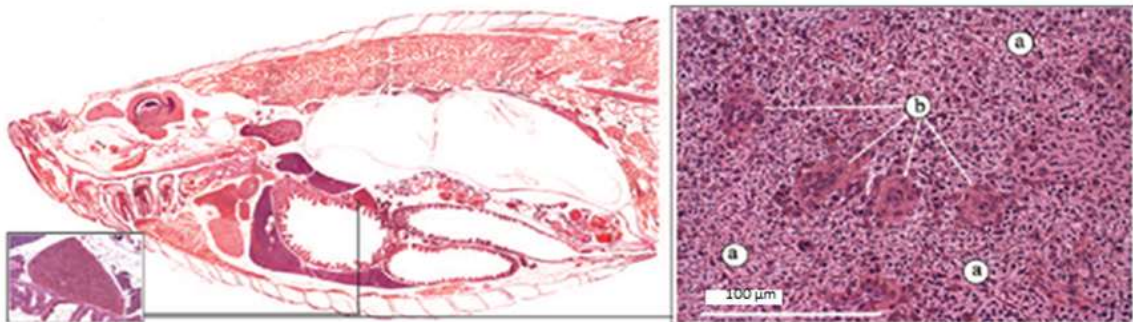


Fig. 9. Bazo del pez cebra adulto. Magnificación a 100 x del tejido, **a**: pulpa roja; **b**: elipsoide ⁽⁵⁰⁾.

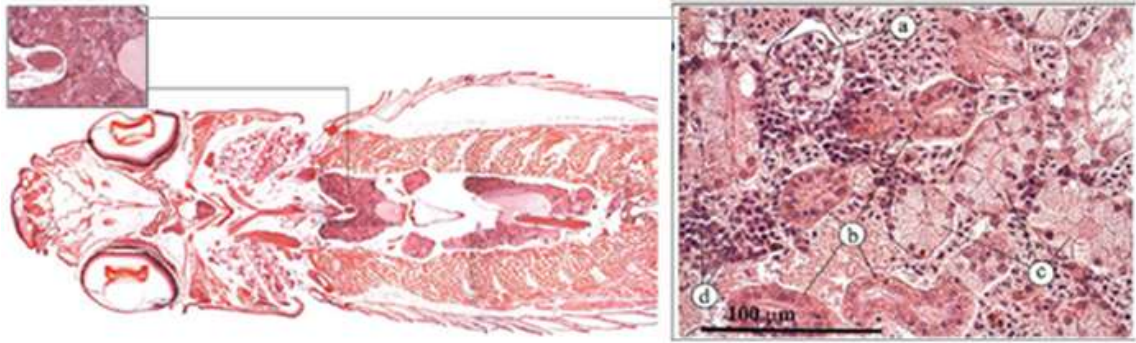


Fig. 10. Riñón del pez cebra adulto. Magnificación a 100 x del tejido, **a**: glomérulo; **b**: túbulo proximal o distal; **c**: túbulo colector; **d**: tejido hematopoyético ⁽⁵⁰⁾.

Las células endoteliales en el pez cebra se alinean formando numerosos senos, a través de los cuales pasa la sangre de la vena porta renal para ser filtrada y depurada de las células seniles; además de ser incorporadas las nuevas células sanguíneas a la circulación (Fig. 11). Los peces poseen una circulación cerrada, simple e incompleta, ya que la sangre sólo fluye una vez por cada vuelta y además en el corazón, de estructura tubular, se da la mezcla de sangre oxigenada con sangre desoxigenada, a diferencia de la circulación sanguínea en el corazón de cuatro cavidades en los mamíferos ⁽⁵¹⁾.

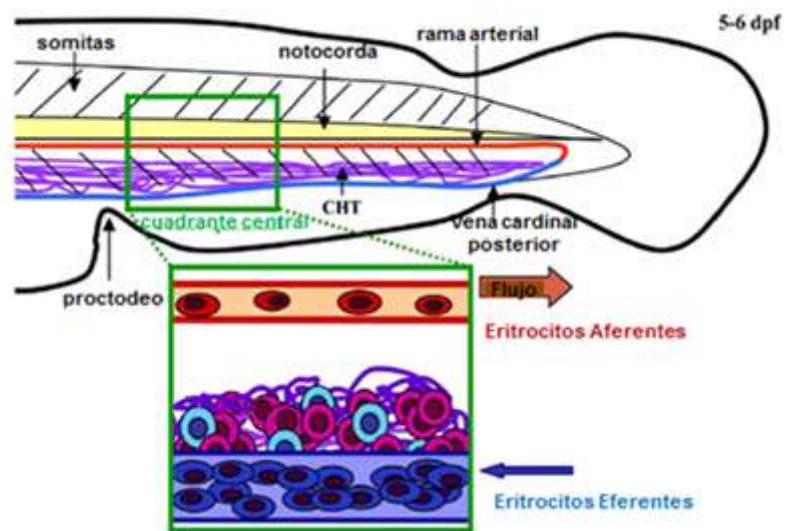


Fig. 11. Circulación sanguínea en la larva del pez cebra de 5-6 dpf ⁽⁵¹⁾.

Las células sanguíneas del pez cebra (Fig. 12 a-g), son similares a las células de los mamíferos, a excepción de los eritrocitos y las plaquetas. Los eritrocitos son ovalados y nucleados, además utilizan el metabolismo aeróbico en lugar de metabolismo anaeróbico para generar trifosfato de adenosina. Las plaquetas (Fig. 12 b-c) también son nucleadas e igualmente desempeñan un papel fundamental en la coagulación sanguínea. Respecto a los leucocitos, al igual que en los mamíferos, tienen un papel importante en la defensa del organismo. Se han identificado dos tipos de granulocitos como lo son los neutrófilos (Fig. 12 g) y los eosinófilos (Fig. 12 c), siendo los primeros los granulocitos más abundantes y con morfología similar a la de los neutrófilos de mamíferos. Cabe destacar que el aspecto de los eosinófilos difiere considerablemente de los eosinófilos de los mamíferos, ya que su núcleo no es segmentado y se ubica hacia la periferia. Los monocitos (Fig. 12 d), morfológicamente son muy similares a los monocitos de los mamíferos y constituyen aproximadamente del 5-15% de los leucocitos circulantes. Bajo las circunstancias adecuadas, estos monocitos se diferencian en macrófagos maduros (Fig. 12 e). Igualmente en los peces se han descrito equivalentes funcionales de los linfocitos B y T (Fig. 12 f), que constituyen aproximadamente el 71-92% de la población de leucocitos circulantes en la sangre del pez cebra ⁽⁵⁰⁾.

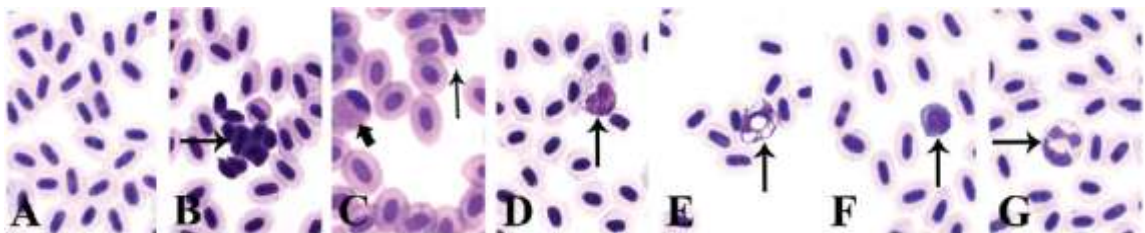


Fig. 12. Sangre periférica, células sanguíneas del pez cebra (*Danio rerio*), **a**: eritrocitos; **b**: plaquetas activadas; **c**: plaqueta inactiva (flecha delgada), granulocito eosinófilo (flecha gruesa); **d**: monocito; **e**: macrófago; **f**: linfocito; **g**: granulocito neutrófilo ⁽⁵⁰⁾.

Las células sanguíneas de particular interés en la presente investigación han sido los eritrocitos, ya que son las células contentivas de la hemoglobina (Hb), importante globulina en el transporte de oxígeno. La hemoglobina es una proteína rica en grupos valina; grupo que le confiere una alta capacidad reactiva ⁽²⁷⁾. En los humanos, presenta cuatro subunidades, dos subunidades alfa (α) y dos subunidades beta (β), relacionadas mediante enlaces no covalentes (Fig. 13). Cada subunidad contiene un grupo Hem, almacenado en la estructura hidrofóbica de una cadena proteica de globina ⁽⁵²⁾.

Otra característica importante de la Hb es su proceso de biosíntesis (Fig. 14), en el cual participan diferentes grupos enzimáticos tanto en la fase mitocondrial como en la citoplasmática. Ambas fases, podrían ser blancos de la acción tóxica de diversos agentes xenobióticos. La síntesis del grupo Hem, se inicia con la condensación de la glicina y el succinil coenzima A, reacción que sucede en el interior mitocondrial en presencia de: cofactor fosfato de piridoxal, hierro ferroso y la enzima delta-amino-levulínico-sintetasa (ALAS) y da origen al ácido delta-aminolevulínico (ALA). El ALA abandona la mitocondria y, en el citoplasma, dos moléculas del ALA se condensan para formar el porfobilinógeno. Este porfobilinógeno, es producto de una reacción de deshidratación catalizada por la enzima ácido δ -aminolevulínico dehidratasa (ALAD), la cual presenta en su sitio activo, grupos sulfhidrilos que requieren el ión zinc como cofactor. Una vez constituido el porfobilinógeno, sufre diversas transformaciones por acción enzimática en esta fase citoplasmática, dando origen al coproporfirinógeno III que ingresa al interior mitocondrial. Dentro de la mitocondria, la acción consecutiva de las enzimas coproporfirinógeno III oxidasa, protoporfirinógeno III oxidasa y ferroquelatasa conlleva

a la síntesis del grupo Hem que a nivel citoplasmático se acopla a la cadena de globulina correspondiente ^(53,54).

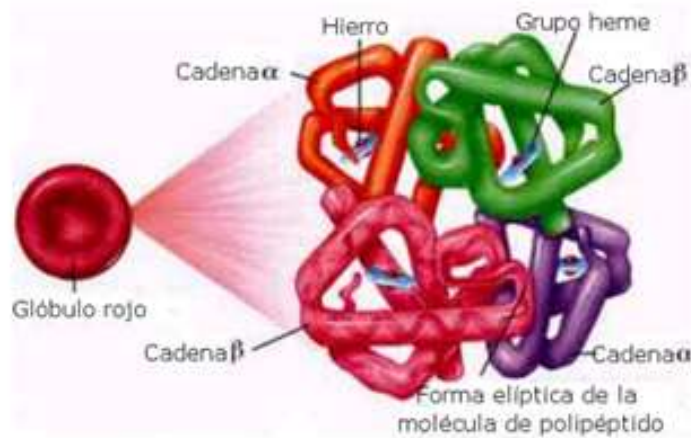


Fig. 13. Estructura de la molécula de hemoglobina humana (www.Ecogenesis.com)

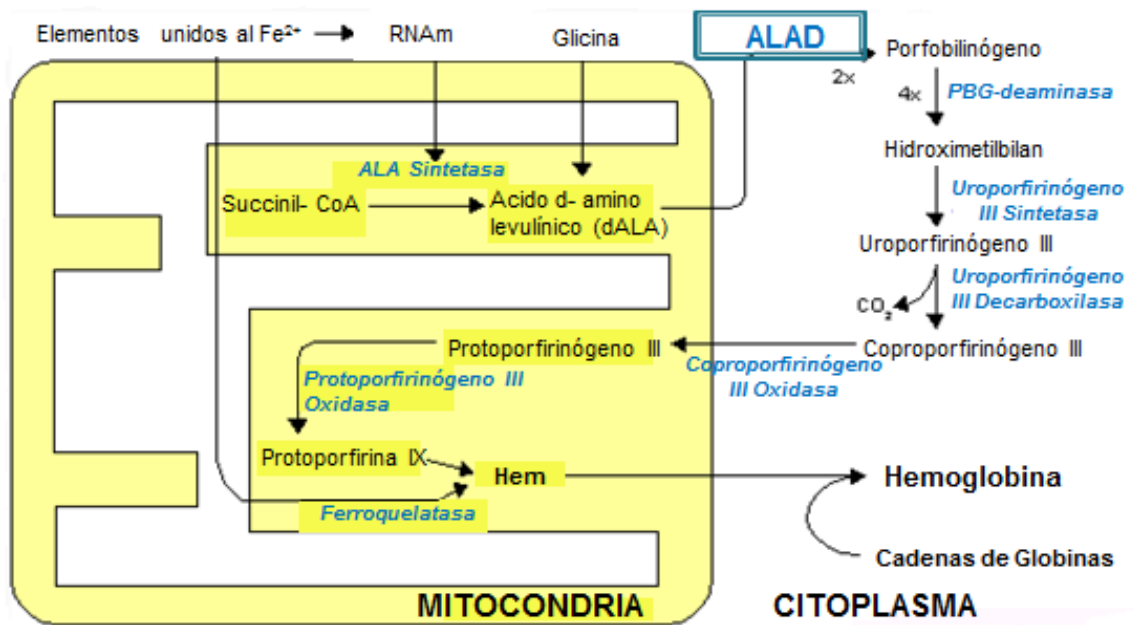


Fig. 14. Biosíntesis de la hemoglobina ⁽⁵⁴⁾.

En este proceso de síntesis de la Hb, de particular interés resulta la actividad de la enzima ALAD (E.C.4.2.1.24), ya que al catalizar una reacción limitante en la formación de la Hb, como es la formación de porfobilinógeno, su inhibición conduce al bloqueo de la síntesis de todos los tetrapirroles naturales como son el grupo Hem y las cobalaminas ⁽⁵⁵⁾.

En el pez cebra, la biosíntesis de la Hb comienza en una etapa temprana del desarrollo de manera similar a la síntesis descrita en los mamíferos ⁽⁵⁶⁾ y la eritropoyesis se inicia aproximadamente a las 15 horas post-fecundación (15 hpf). Los glóbulos rojos maduros, que contienen la Hb, están presentes en la circulación luego de las 24 hpf ⁽⁵⁷⁾. Se ha reportado que la hemoglobina del pez cebra, al igual que en los mamíferos, presenta dos cadenas alfa y dos cadenas beta, aumentando en gran medida, la capacidad de oxígeno en la sangre, permitiendo a su vez el transporte eficiente de este gas desde los pulmones, las branquias y la piel, hacia los órganos internos ⁽⁵⁸⁾.

II.f. Sistema Nervioso

En términos generales, en la organización del sistema nervioso (SN) de todos los vertebrados se destaca el encéfalo y la médula espinal (Fig. 15), originados a partir del neuroectodermo de la placa neural ⁽⁵⁹⁾. Particularmente, en la topografía cerebral del pez cebra, el encéfalo se diferencia en tres porciones principales: una anterior, una media y una posterior (Fig.16), las cuales actúan como plataforma de recepción de diversos estímulos ambientales. En la parte anterior del encéfalo, se reciben estímulos olfatorios, en la parte media los estímulos ópticos y en la parte posterior se captan los estímulos auditivos, vibratorios, entre otros. Los estímulos somáticos del resto del cuerpo son canalizados por la médula espinal con proyección hacia el encéfalo ^(4,60).

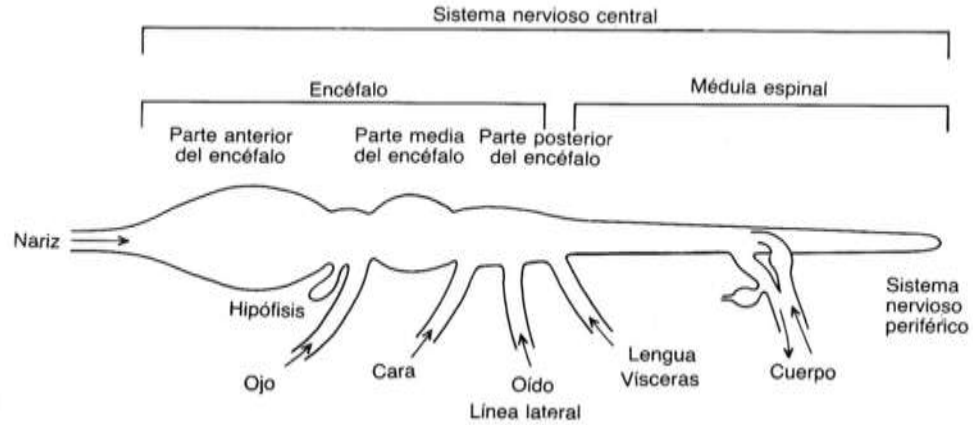


Fig. 15. Plan básico de organización del Sistema Nervioso (SN) en vertebrados ⁽⁶⁰⁾.

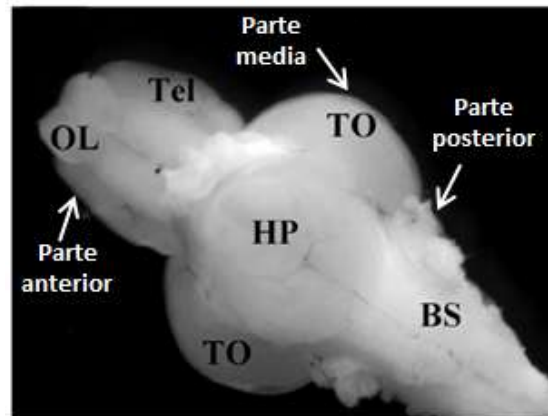


Fig. 16. Cerebro del pez cebra adulto de 5 meses de edad (lado ventral). OL: lóbulo olfativo, Tel: telencéfalo, TO: tectum óptico, HP: hipotálamo, BS: tronco cerebral. Fuente: Vargas y col., 2011, modificado por Hernández C, 2014 ⁽⁶¹⁾.

Sobre esta plataforma receptora de los diversos estímulos se encuentran las principales estructuras mecanosensoriales. En los peces, se distinguen el oído interno y el sistema de la línea lateral (LL). En el estadio larvario del pez cebra, se destaca este sistema, como un antiguo rasgo evolutivo en los vertebrados, el cual permite captar vibraciones en el medio acuoso, ayudando al pez a percibir variaciones de las corrientes del medio, capturar las presas, desplazarse y evitar a los depredadores, entre otros ⁽⁵⁾.

El sistema de la línea lateral (LL) está conformado, entre otras estructuras, por los neuromastomas (Fig. 17 a-b), los cuales son células pilosas agrupadas a manera de racimos, encapsuladas y conectadas por fibras aferentes, tanto a nivel craneal como troncal. Estas estructuras sensoriales en el pez se ubican en diferentes puntos de la superficie y del interior del cuerpo (Fig. 18 a-b y Fig. 19 a-e). Su distribución superficial las hace particularmente efectivas en el movimiento de los peces ^(5,60).

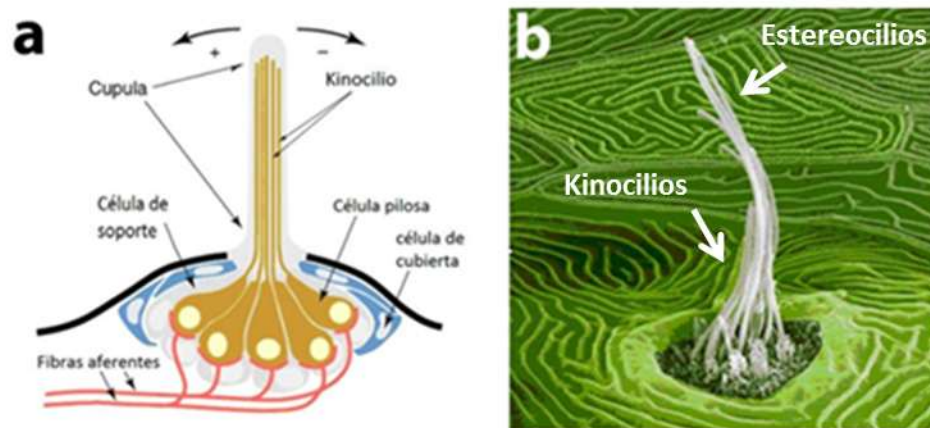


Fig. 17. **a)** Esquema de la estructura del neuromastoma. **b)** Imagen del neuromastoma con microscopio electrónico de barrido, se observa la diferencia de longitud entre un Kinocilio y los estereocilios ⁽⁵⁾.

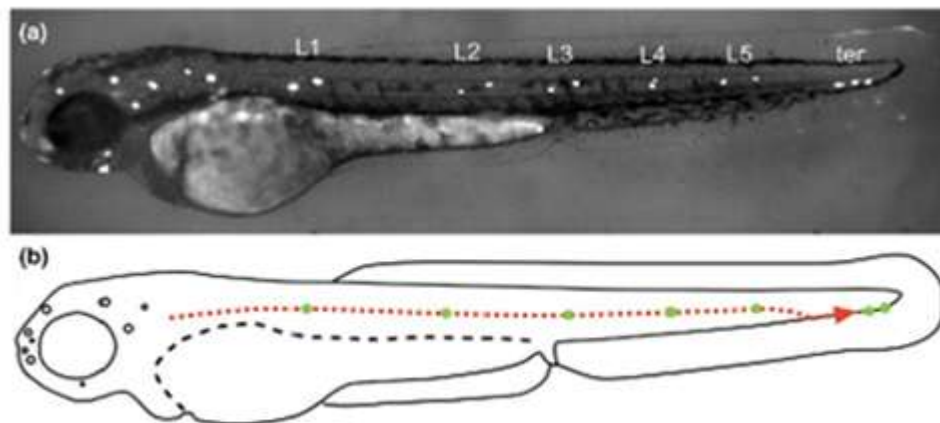


Fig. 18. **a)** Patrón de distribución de los neuromastomas craneales y troncales en larva del pez cebra 5dpf. **b)** Esquema de organización del desarrollo de los neuromastomas (L1-L5) ⁽⁴⁾.

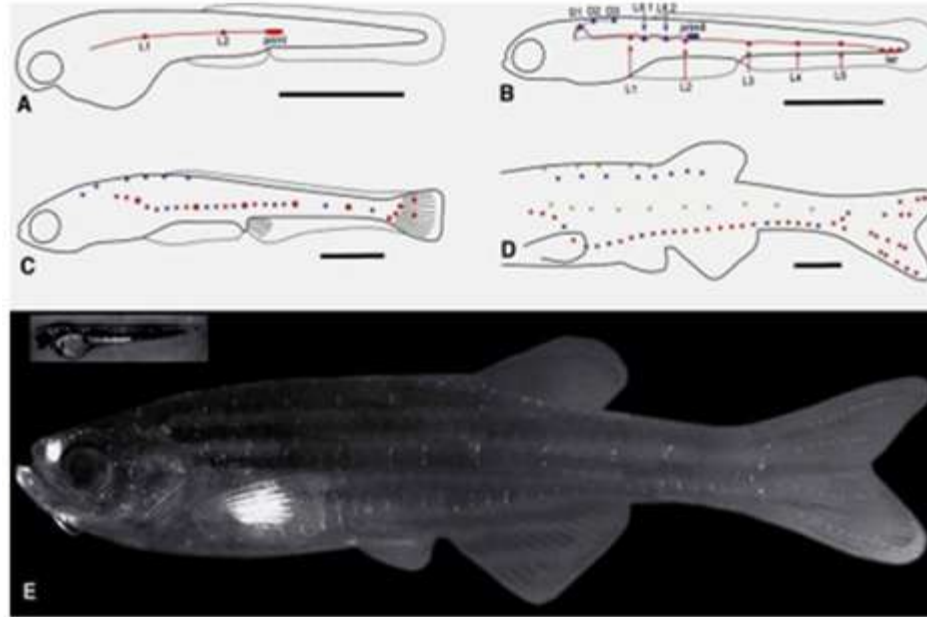


Fig. 19. Desarrollo del sistema de Línea Lateral Posterior (LLP). **A:** en la larva de 32hpf, el primordio (Prim1) va con migración caudal a partir de los neuromastos L1 y L2 (rojo). **B:** en la larva a los 3dpf, Prim1 alcanza la punta de la cola donde se fragmenta en 2 o 3 neuromastos terminales; aproximadamente a las 36hpf se forma segundo primordio, Prim2 a partir de Prim1 y sigue en paralelo el mismo trayecto de Prim1. Luego, se inicia PrimD en la línea dorsal (azul). **C:** a las 3 semanas post-fecundación hay formación de neuromastos a partir de las células interneuromásticas depositadas por Prim1 (rojo); Prim2 y PrimD han completado su trayecto. Los neuromastos de la LLP se han desplazado a posiciones más ventrales. **D:** en la transición de larva a juvenil, las líneas dorsal y lateral se han completado y desplazado ventralmente. Se han formado dos nuevas líneas (verde). **E:** adulto joven expuesto a luz fluorescente con coloración vital específica para células pilosas ⁽⁵⁾.

Entre otra de las plataformas receptoras de estímulos ambientales están los melanóforos, células derivadas de la cresta neural (Fig. 20). Los melanóforos son células de aspecto estrellado, debido a la disposición intracelular de los melanosomas que se distribuyen a manera de rayos desde el núcleo y hacia la periferia ⁽⁶⁾. Los melanosomas son vesículas contentivas de melanina, un pigmento oscuro, derivado de la tirosina oxidado y no fluorescente que regula la pigmentación en los animales de color. Cabe destacar que los melanóforos son funcionalmente modificados por células musculares lisas que regulan el tráfico de los melanosomas en los filamentos del citoesqueleto

generando amplios patrones cromáticos llamativos; por lo tanto, si el ambiente es oscuro, se da la contracción del melanóforo lo que produce la agregación de los gránulos de melanina y el pez presentará una coloración oscura; si el ambiente es luminoso, se da la relajación del melanóforo lo que produce la dispersión del pigmento por lo que el pez presentará una coloración clara en sus bandas. Los eventos bioquímicos vinculados a estos procesos de modificación del color requieren de la participación del calcio extracelular ⁽⁶⁾.

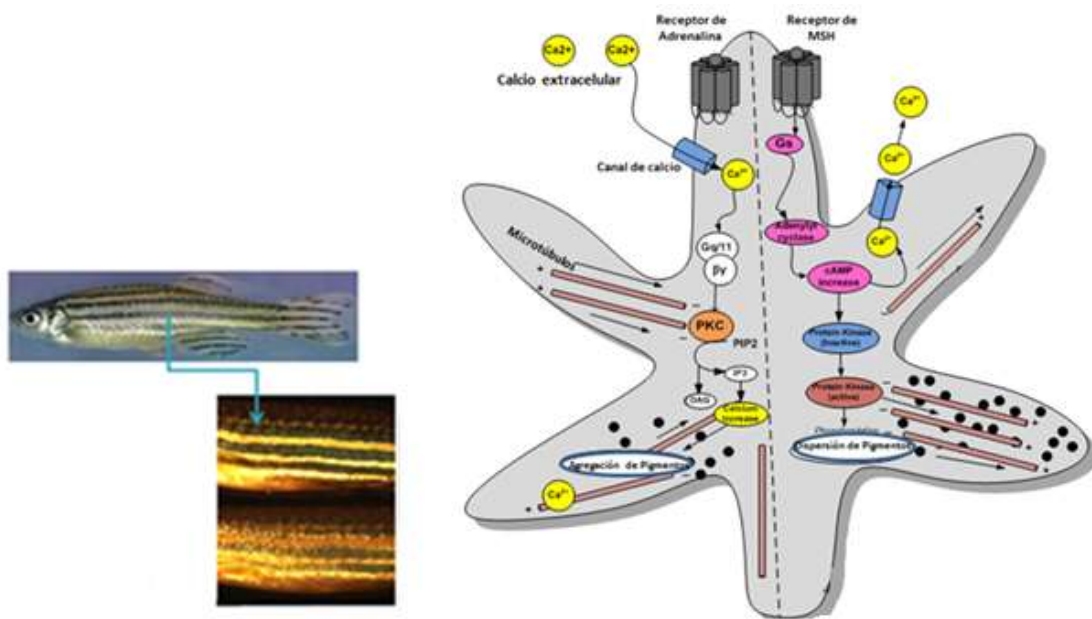


Fig. 20. Esquema del melanóforo. Modelo del rol crucial del Ca^{2+} y MSH (Hormona Estimulante de Melanocitos) en el movimiento bidireccional de los melanóforos ⁽⁶⁾. Ligando como neurotransmisores y hormonas se unen a receptores específicos para activar la contracción del músculo liso. El papel crucial de Ca^{2+} y MSH en el movimiento bidireccional de melanóforos, es seguido por la activación de la fosfolipasa C (PLC) promoviendo que el inositol trifosfato (IP_3)-dependiente de la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares y que el diacilglicerol (DAG)-sensible activación de la proteína quinasa C (PKC), faciliten la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de calcio dependientes de voltaje, resultando en la agregación de pigmento. La estimulación de los receptores alfa MSH que se acopla a proteínas G_{α} estimulando a su vez la adenilato ciclasa y aumenta el cAMP intracelular activa una bomba de calcio que conduce a la expulsión del mismo fuera de las células resultando en la dispersión de pigmento. En el caso de las células pigmentadas, la acción de la concentración hormonal de los melanocitos (MCH) se ve reforzada por la ausencia de Ca^{2+} intracelular, que en el caso del músculo liso puede ser un homólogo desencadenado por β receptores adrenérgicos (noradrenalina o NE) ⁽⁶⁾.

A nivel funcional, todas estas estructuras receptoras de los estímulos sensoriales se acoplan a circuitos neuronales que median las respectivas respuestas a los estímulos percibidos. Particularmente, en el pez cebra, han sido identificados los circuitos neuronales dopaminérgicos, serotoninérgicos y colinérgicos ⁽⁶²⁾. Como es sabido, el circuito colinérgico es un importante modulador de la neurotransmisión, siendo reconocido por su participación en el control de la actividad locomotora, el comportamiento emocional y en los procesos cognitivos ⁽⁶³⁾. La acción colinérgica, está mediada por la acetilcolina (ACh), un neurotransmisor que se sintetiza a partir de la colina y la acetil-coenzima A, en una reacción catalizada por la colinacetiltransferasa. La ACh, estimula a los receptores colinérgicos y es rápidamente hidrolizada a colina y acetato, por acción de la acetilcolinesterasa (AChE; EC 3.1.1.7) ^(63,64). Particularmente, en el pez cebra ha sido demostrado que la AChE es codificada por un solo gen que ha sido clonado, secuenciado y funcionalmente detectado ^(63,65). Debido a que la AChE se encuentra tanto en el tejido nervioso como en el glóbulo rojo, los cambios en su actividad a nivel sanguíneo podrían correlacionarse con los efectos tóxicos a nivel del sistema nervioso ⁽⁶⁶⁾.

Todas estas características morfo-funcionales en el pez cebra (*Danio rerio*), lo han definido como un modelo animal clave en la neurociencia ⁽⁶¹⁾. Como modelo experimental, ha permitido evaluar la organogénesis, con el uso de técnicas convencionales de microscopía, lo que ha favorecido el estudio de procesos básicos del desarrollo. Con ello, se ha logrado visualizar estructuras sensoriales en el estadio larvario, como los neuromastomas de la línea lateral ⁽³⁹⁾. Cabe destacar que el pez cebra, ha sido considerado como un modelo predilecto en la comprensión de las alteraciones

morfo-funcionales de patologías inducidas por sustancias tóxicas, lo que justifica emplearlo en la evaluación de la toxicidad por ACR.

II.g. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

La exposición a la acrilamida (ACR) es una agresión tóxica para el organismo humano que ha recobrado vigencia, debido a la ubicuidad de dicho agente al identificarse su presencia en agua potable, productos de uso comercial, humo del cigarrillo, entre otras fuentes. En la última década a nivel mundial, se ha divulgado una importante fuente de contaminación que no solo ha tocado el ambiente industrializado, sino que ha invadido espacios fundamentales para el ser humano como es la alimentación. Por ello, se han activado las alarmas sanitarias a nivel internacional, lo que ha incentivado la investigación a nivel experimental a objeto de indagar sobre los efectos y los mecanismos de toxicidad de este importante xenobiótico. Con el presente estudio se pretende aportar información acerca de las características morfo-funcionales vinculadas a la posible acción hemato-neurotóxica de la ACR en un novel modelo experimental como es el pez cebra.

II.h. HIPÓTESIS

Si la ACR interviene sobre unidades morfo-funcionales tales como el sistema hematopoyético y órganos sensoriales, en su mayoría controlados por el sistema nervioso, entonces, el desarrollo de bioensayos que permitan la identificación de las señales de daño emitidas por dichas unidades morfo-funcionales, podrían contribuir en la comprensión de la etiología del daño inducido por este agente, toxicológicamente activo, además de entender la posible relación hemato-neurológica propuesta.

II.i. OBJETIVOS

II.i.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la respuesta hemato-neurológica en adultos y larvas del pez cebra (*Danio rerio*) expuestos a la acrilamida.

II.i.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estimar la concentración letal media (CL₅₀) de la ACR, tanto en el modelo larvario como en el pez cebra adulto (*Danio rerio*).

2. Analizar el efecto de la acrilamida sobre la unidad morfo-funcional hematopoyética:

.- Morfología del tejido sanguíneo del pez cebra adulto.

.- Hemoglobina (Hb) en la sangre del pez cebra adulto.

.- Actividad enzimática de la ácido δ -aminolevulínico dehidratasa (ALAD) y la acetilcolinesterasa (AChE) en la sangre total del pez cebra adulto.

3. Analizar el efecto de la acrilamida sobre la unidad morfo-funcional órganos sensoriales:

.- Actividad motora de adultos y larvas del pez cebra.

.- Estructuras de órganos sensoriales, como son los neuromastomas y los melanóforos en larvas del pez cebra.

4. Evaluar el efecto sistémico de la acrilamida en el pez cebra adulto.

III MATERIALES Y MÉTODOS

III.a. Obtención del pez cebra adulto

Los peces cebra adultos de cepa silvestre (wt) fueron obtenidos de una casa comercial. Previo a la incorporación de los mismos al acuario, se requirió de un proceso de adaptación evitando cambios bruscos de ambiente (Fig. 21). En primer lugar, se debió introducir el medio de transporte cerrado de los peces (empaque plástico) dentro del acuario, a fin de equilibrar la temperatura dentro del medio de transporte con el agua del acuario; luego de 5 minutos, se procedió a abrir el medio de transporte para favorecer el intercambio gaseoso con el ambiente. Seguidamente, se agregaron aproximadamente 200 ml de agua del acuario dentro del medio de transporte, se dejó reposar durante 10 minutos procedimiento que se repitió dos veces más; se observó el comportamiento de los peces ya que se cambió la temperatura, el pH y los nutrientes del ambiente. Transcurrida media hora del contacto de los peces con el agua del acuario, con la ayuda de una malla los peces fueron liberados en el acuario. Los peces fueron mantenidos en el laboratorio en un acuario de vidrio de 120 cm de largo, 50 cm de profundidad y 30 cm de alto, provisto de filtro interno de carbón activado y un aireador para la oxigenación del agua. Se mantuvieron alimentados, tres veces al día, con alimento en hojuelas para peces (Kantal S.A.). Transcurridos 20 días de acondicionamiento de los peces, los mismos fueron seleccionados para la realización de los bioensayos.

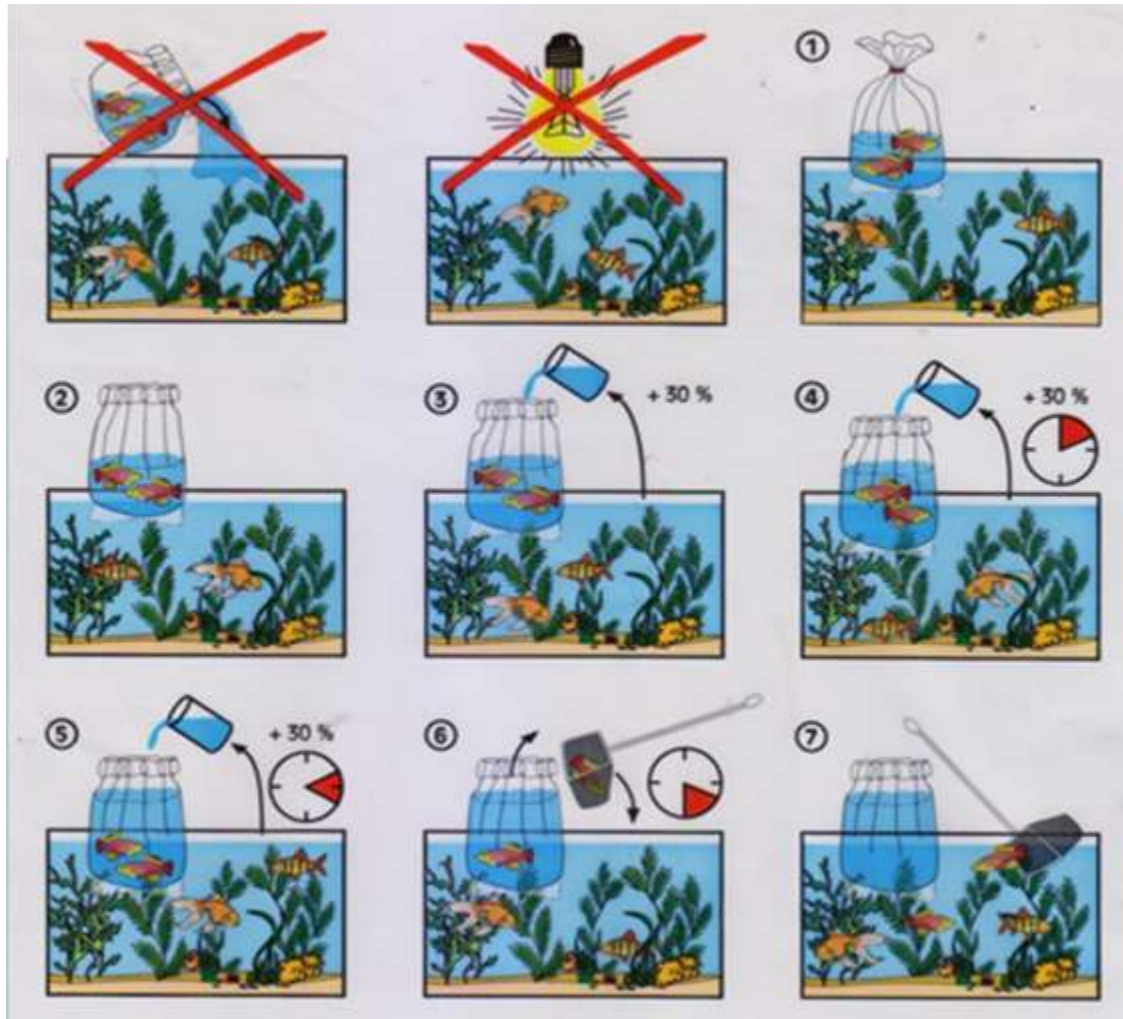


Fig. 21. Protocolo de incorporación de los peces al nuevo ambiente. Fuente: casa comercial.

III.a.1. Obtención de los huevos y las larvas del pez cebrá

Para la obtención de los huevos y las larvas, se utilizaron peces cebrá adultos de tipo silvestre (wt), posterior al período de acondicionamiento de 20 días. La puesta de huevos se indujo luego de un ciclo de luz-oscuridad de 16 y 8 horas respectivamente, con lámparas de 11 vatios FLC (lámparas fluorescentes compactas), manteniéndose una temperatura entre 21 y 25 °C. Una vez que las hembras liberan los huevos en el agua, los mismos son fecundados por los machos. Debido a que los huevos no son adhesivos, caen libremente, depositándose en una malla que se encontraba en el fondo del acuario,

evitando así que fueran consumidos por los peces adultos. Se recolectaron los huevos en tandas de 100-200 por día, fueron extraídos, lavados y colocados en placas de Petri para ser incubados a 28 °C hasta que alcanzaron los 5 días post-fecundación (5 dpf), estadio que se utilizó para la dosificación con ACR ⁽⁶⁷⁾.

III.b. Dosificación de Acrilamida en el modelo del pez cebra adulto y cálculo de la CL₅₀

Para calcular la concentración letal media (CL₅₀) de la ACR, en el modelo del pez cebra adulto, se procedió a realizar una curva dosis–respuesta, a fin de conocer la concentración de ACR que generó el efecto esperado en el 50% de los organismos expuestos en un tiempo definido. Como indicador de la respuesta esperada, se utilizó la muerte del organismo expuesto. Para la dosificación se preparó una solución madre de 0,5 mg/ml, concentración equivalente a 7 mM, de ACR (Promega), calculada en base a la concentración neurotóxica de ACR estimada por la OMS ⁽³⁰⁾. A partir de esta solución madre se realizaron diluciones seriadas, teniendo el siguiente rango de concentraciones a ensayar: 0,015; 0,031; 0,062; 0,125; 0,25; 0,5 mg/ml de ACR en agua de pecera. Este ensayo se realizó en peceras con capacidad para tres litros de agua (Fig. 22), provistas de un aireador, para garantizar niveles de oxigenación adecuados, haciendo uso de pez cebra adulto, tanto hembras como machos, los cuales fueron expuestos a las distintas concentraciones de ACR durante 8 días. Cada día se renovaron las soluciones del tóxico y el agua de los peces controles, a fin de evitar la acumulación de desechos procedentes de los animales experimentales. Diariamente se monitoreo el peso promedio tanto de los peces tratados con la ACR como de los peces controles, utilizando una balanza Mettler PN1210 cuya precisión es de 0,01 gramos. Cada bioensayo se realizó por duplicado, y

en cada pecera se colocaron 7 peces en un volumen final de 2 litros de las diferentes soluciones de ACR evaluadas. Se mantuvo constante el suministro de alimento en 200 mg, a fin de garantizar la adecuada disponibilidad del mismo.



Fig. 22. Peceras para dosificación del pez cebrá adulto.

Todo esto con el propósito de establecer el rango de concentraciones que permitió calcular la CL_{50} por el método de Spearman-Kärber ⁽⁶⁸⁾. Este es un método estadístico aproximado no paramétrico que proporciona una buena estimación de la media y la desviación estándar. Si la distribución es simétrica, se obtiene una estimación de la concentración letal media (CL_{50}) con un intervalo de confianza del 95%. Bajo las condiciones mencionadas, y si además la distribución considerada es más normal que logarítmica, se cumple que:

$$CL_{50} = m + X_K - d (S_1 - 1/2)$$

Dónde:

X_K = dosis mínima a partir de la cual se obtiene 100% de muerte.

d = intervalo entre cada dos dosis.

S_1 = suma de las fracciones de individuos que presentaron muerte.

La desviación estándar SCL_{50} , o más fácil S_m , se determina mediante la siguiente ecuación:

$$S_m = d \sqrt{2(S_2) - S_1 - (S_1)^2 - (1/12)}$$

Dónde, S_2 = suma de la fracción acumulada de los individuos que presentaron muerte (68).

Además del método Spearman-Kärber, se utilizó el método Probit (69) un método paramétrico, que permite relacionar una variable independiente (concentración del tóxico) y una variable dependiente (respuesta=mortalidad), para ello, se definieron los siguientes parámetros: a) concentración de ACR (d), b) número de individuos expuestos (n), c) número de individuos muertos (r), y d) porcentaje del efecto causado (p). La representación gráfica del porcentaje (%) de muerte versus la concentración de ACR, generó una curva sigmoidea, que posteriormente, al transformar los valores de porcentaje de muerte en valores Probit (tabla IV) y los valores de concentración de ACR en expresión logarítmica, permitió la transformación de la curva en un sistema lineal que fue analizado como una regresión, con lo cual fue posible estimar la correlación entre las variables. La fórmula de Probit para hallar el porcentaje de efecto (p %) a través de p % = (número de individuos muertos o afectados r / número de individuos n) x 100. Lo que se traduce en la siguiente ecuación:

$$P\% = (r/n) \times 100$$

Tabla IV. Relación entre el Probit empírico y el porcentaje de mortalidad.

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2,67	2,95	3,12	3,25	3,36	3,45	3,52	3,59	3,66
10	3,72	3,77	3,82	3,87	3,92	3,96	4,01	4,05	4,08	4,12
20	4,16	4,19	4,23	4,26	4,29	4,33	4,36	4,39	4,42	4,45
30	4,48	4,50	4,53	4,56	4,59	4,61	4,64	4,67	4,69	4,72
40	4,75	4,77	4,80	4,82	4,85	4,87	4,90	4,92	4,95	4,97
50	5,00	5,03	5,05	5,08	5,10	5,13	5,15	5,18	5,20	5,23
60	5,25	5,28	5,31	5,33	5,36	5,39	5,41	5,44	5,47	5,50
70	5,52	5,55	5,58	5,61	5,64	5,67	5,71	5,74	5,77	5,81
80	5,84	5,88	5,92	5,95	5,99	6,04	6,08	6,13	6,18	6,23
90	6,28	6,34	6,41	6,48	6,55	6,64	6,75	6,88	7,05	7,33
%	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
99 ^a	7,33	7,37	7,41	7,46	7,51	7,58	7,65	7,75	7,88	9,09

^a Valores entre 99,0 y 99,9.

Fuente: Díaz y col., 2005 ⁽⁶⁹⁾.

III.b.1. Dosificación de Acrilamida en modelo larvario del pez cebrá y cálculo de la CL₅₀

Para determinar la concentración letal media (CL₅₀) de la ACR en el modelo larvario del pez cebrá, se procedió de manera similar al protocolo descrito en el modelo del pez cebrá adulto para establecer la relación dosis–respuesta, a fin de conocer la concentración de ACR que generó la mortalidad en el 50% de los organismos expuesto en un tiempo definido. Se probaron los mismos rangos de concentraciones de ACR que en el modelo adulto. Este bioensayo se realizó en placas de dosificación de 24 pozos (Fig. 23), haciendo uso de larvas de pez cebrá de 5 dpf, las cuales fueron expuestas a las distintas concentraciones de ACR durante 24 horas. Cada bioensayo se realizó por duplicado, y en cada pozo se colocaron 10 larvas en un volumen de 2000 µl de las diferentes soluciones evaluadas. Todo esto con el propósito de establecer el rango de concentraciones que permitió calcular la CL₅₀ por el método de Spearman-Kärber, previamente descrito.

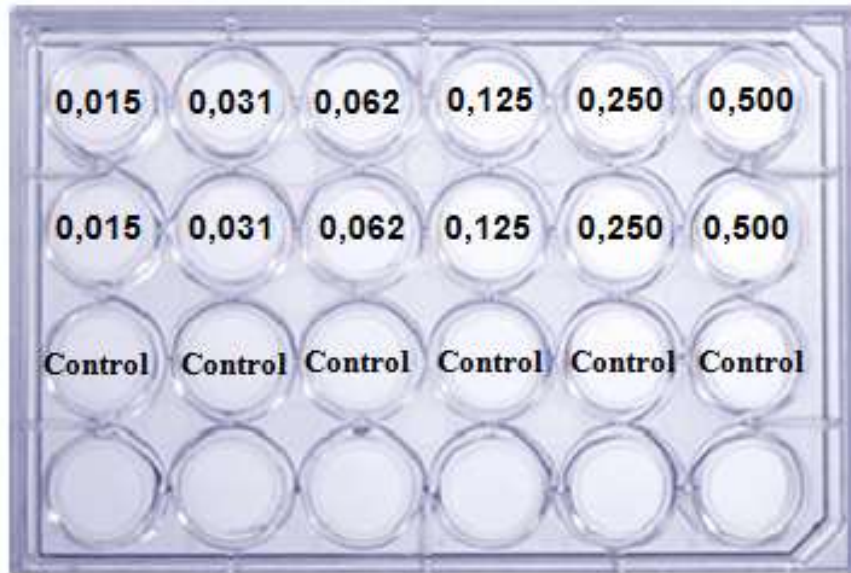


Fig. 23. Placa de dosificación de 24 pozos. (http://www.coldspring.com.cn/confocal_dish.htm)

Una vez obtenidas las concentraciones letales medias (CL_{50}) y sus respectivas desviaciones estándar para cada población adultos y larvas de pez cebrá, todos los bioensayos fueron realizados a las tres concentraciones a saber: concentración sub-

letal media (CL_{50}^-), concentración letal media (CL_{50}) y concentración supra-letal (CL_{50}^+).

III.c. Extracción de la muestra de sangre del pez cebrá adulto

Transcurridos los 8 días de tratamiento con la ACR, en la población sobreviviente, se procedió a realizar la extracción de la muestra de sangre en la arteria aorta dorsal del pez cebrá adulto, según el protocolo de Pedroso y col. (2012)⁽⁷⁰⁾, basado en estándares internacionales de bioética. Para ello, se anestesiaron los peces colocándolos en una cubeta de 8x11x4 cm, con un sistema de agua con hielo, durante 1 minuto 30 segundos hasta alcanzar la inmovilización por hipotermia. Se procedió a fijar al pez en un sistema sobre una cápsula de Petri para la disección; se realizó un lavado

con heparina en la zona de corte, ubicada entre la porción cefálica y la aleta dorso-lateral derecha (arteria aorta dorsal). Una vez obtenido el flujo sanguíneo se recogió rápidamente la muestra con la punta heparinizada de una micropipeta de 10 μ L, por cada pez dependiendo del tamaño se colecto aproximadamente entre 5 y 10 μ l de sangre, por lo que se trabajó con el pool de la sangre de los peces tanto en el caso de los peces tratados como en el caso de los peces controles. La sangre fue colocada en un criotubo Ependorff de 0,5 ml, previamente heparinizado, a partir del cual se distribuyó la muestra según el volumen requerido en los diferentes ensayos de hematotoxicidad ⁽⁷¹⁾. Luego del sacrificio de los peces, los mismos fueron fijados con formalina buffer al 10% para la realización de los análisis de cortes histológicos.

III.d. Evaluación de la hematotoxicidad

III. d.1. Análisis de la morfología del tejido sanguíneo del pez cebra adulto expuesto a la Acrilamida.

Se realizaron frotis de la sangre tanto de los peces tratados con la ACR como de los controles, mediante el extendido de una gota de sangre de 3-4 mm de diámetro en la superficie de una lámina portaobjetos (Fig. 24), a fin de evaluar la morfología de las células sanguíneas, se hizo uso de la tinción de Giemsa y de la sonda fluorescente de Hoechst, ésta última debido a que todas las células del pez cebra son nucleadas.

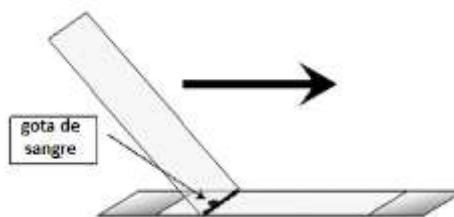


Fig. 24. Extendido del frotis de sangre periférica.

Tinción de Giemsa: es un método estándar para el examen de frotis sanguíneos, cortes histológicos y otro tipo de muestras biológicas. La tinción de Giemsa emplea como colorante fundamental una mezcla de derivados tiacínicos catiónicos (azur A, B y azul de metileno) utilizados para teñir los núcleos celulares, y de eosina como colorante citoplasmático de carácter aniónico. Esta mezcla es soluble en alcohol metílico, por lo que en disolución, los componentes moleculares electropositivos y electronegativos se combinan entre sí para formar los derivados salinos (eosianato de azur A, B y de azul de metileno). El fundamento de la técnica radica en la disociación controlada de las sales de eosianato, lo cual ocurre al insolubilizar la mezcla de Giemsa por dilución en agua destilada; así, la eosina liberada colorea el componente extracelular y determinadas estructuras acidófilas y los derivados de azur, colorean las estructuras de carácter basófilo. Como resultado de esta tinción, los eritrocitos se tiñen de rosa–naranja, los núcleos de azul–púrpura y el citoplasma de rosa ⁽⁷²⁾. Metodología: el frotis de sangre periférica se fijó con metanol, posterior a ello se colocó el colorante de Giemsa, se dejó actuar durante 2 minutos, luego se lavó la lámina con agua corriente. Una vez escurridos los frotis, fueron observados bajo el microscopio de luz a 40x de aumento.

Sonda de Hoechst: es una sonda útil en el marcaje del ADN en la microscopía de fluorescencia y en la clasificación de las células según sean o no activadas por fluorescencia (FACS, fluorescent-activated cell sorting). Es habitualmente utilizado para visualizar los núcleos y las mitocondrias. Se emplea la sonda de Hoechst 33258 (Cloruro de bis-benzimida), que es excitado por la luz ultravioleta alrededor de 350 nm, y emite luz de fluorescencia azul/cian con un máximo de emisión alrededor de 461 nm. Esta

sonda se puede utilizar tanto en el estudio de células vivas como de células fijadas, por ser lipofílico interactúa fácilmente con las membranas celulares ^(73,74). Metodología: el frotis de sangre periférica se fijó con metanol, posteriormente se colocó una gota del colorante de Hoechst, se dejó actuar durante 1 minuto y se observó bajo el microscopio de fluorescencia con excitación 350 nm. Se realizaron registros fotográficos de las muestras, los cuales fueron analizados a través del programa ImageJ ⁽⁷⁵⁾.

III.d.2. Evaluación de la Hemoglobina en la sangre del pez cebra adulto expuesto a la Acrilamida mediante electroforesis en acetato de celulosa.

La electroforesis es una técnica utilizada en la separación analítica de moléculas biológicas en función de su carga eléctrica. En un medio alcalino la mayoría de las proteínas presentan cargas negativas, y cuando son sometidas a un campo eléctrico migran hacia el ánodo con una velocidad que es proporcional a su carga neta. Debido a la naturaleza anfótera de las proteínas, la carga eléctrica de las mismas se modifica con el pH del medio, definiéndose entonces como punto isoeléctrico (pI), al pH en el cual la molécula no tiene carga eléctrica neta por lo que no migrará en un campo eléctrico. Si el pH se encuentra por debajo del pI, predominan las cargas positivas e inversamente a un pH superior al pI predominan las cargas negativas ⁽⁷⁶⁾. Metodología: se tomaron 10 µl de sangre total del pez cebra adulto. Las muestras tanto de peces tratados con la ACR como de peces controles fueron cargadas en placas de acetato de celulosa Titan III-H (Helena Laboratories) de 60 x 76 mm, y posteriormente se realizó la corrida electroforética en el equipo Consort EV265 durante una hora a 300 V, en un buffer borato de pH 8,6 preparado de la siguiente manera: se mezcló 0,018 mol/L de Tris, 0,1 mol/L de ácido bórico, 2 mmol/L de EDTA. Culminado el tiempo de corrida, la placa se reveló con

Rojo de Ponceau S al 1% en ácido tricloroacético al 5% durante 15 minutos. Luego, se realizaron lavados repetidos en ácido acético al 5% para el aclaramiento de la placa y se realizó un registro fotográfico bajo luz indirecta ⁽⁷⁷⁾.

III.d.3. Evaluación de la actividad enzimática

III.d.3.1. Ácido δ -aminolevulínico dehidratasa (ALAD), en sangre de peces cebra adultos expuestos a la Acrilamida

La enzima ALAD, transforma al ácido delta-aminolevulínico en porfobilinógeno. En sangre periférica, la reacción se detiene en esta etapa de monopirrol (PBG) en lugar de continuar hacia porfirina, por consiguiente, la actividad de la ALAD en eritrocitos se puede determinar mediante la incubación de la muestra de sangre periférica con el sustrato clorhidrato de ácido delta-aminolevulínico (ALA) y la medición ulterior del porfobilinógeno formado a 555 nm. Metodología: luego de la obtención de la muestra de sangre heparinizada del pez cebra, se midió el hematocrito en una alícuota de la muestra (dato requerido para el cálculo de la actividad enzimática). Para la determinación de la actividad de la ALAD, se preparó la mezcla de incubación. Se añadió 100 μ l de sangre del pez cebra a 1,4 ml del reactivo Tritón X-100 para garantizar la hemólisis inmediata. Se agregó 1 ml de sustrato ALA tamponado en buffer citrato-fosfato de pH 6,65 y se mezcló vigorosamente. Seguidamente, se tomó 1 ml de la mezcla para preparar un blanco de muestra, el cual se añadió rápidamente a un tubo con 1 ml de N-etilmaleimida en ácido tricloro-acético un agente desproteinizante. El tubo contentivo del resto de la mezcla reactiva (1,5 ml) se incubó a 38 °C durante 1 hora. Al finalizar el período de incubación, se agregó 1,5 ml del agente desproteinizante. Posteriormente, se mezcló y se

centrifugaron ambos tubos durante 10 minutos a 2000 rpm. Luego de la centrifugación, se tomaron 1,5 ml del sobrenadante, colocándose en nuevos tubos a los cuales se les añadió 1,5 ml del reactivo de Ehrlich como agente revelador de la reacción. Se mezclaron las soluciones, luego de ello se dejaron reposar durante 13 minutos para el desarrollo del color. Transcurrido el período de reposo se leyó la absorbancia a 555 nm, usando agua destilada para ajustar el cero del equipo. Los cálculos de la actividad de la enzima ácido δ -aminolevulínico dehidratasa (ALAD), tanto en los controles como en los peces tratados con la ACR, se realizaron haciendo uso de la siguiente fórmula ⁽⁷⁸⁾:

$$\frac{(\text{D.O muestra} - \text{D.O. blanco}) \times 100 \times 25 \times 1}{\text{Hematocrito} \times 0,1} = \text{Unidades de ALAD/ml de GR}$$

D.O. muestra: Densidad óptica de la muestra

D.O. blanco: Densidad óptica del blanco

100/Hematocrito: corrección para la fracción eritrocítica de sangre total

25: factor de dilución de la sangre

0,1: corrección para la definición de actividad enzimática; definiéndose una unidad como un aumento de la absorbancia a 555 nm de 0,100 por hora a 38 °C.

III.d.3.2. Acetilcolinesterasa (AChE), en la sangre del peces cebras adultos expuestos a la Acrilamida.

Se utilizó el método de Fleisher y Pope ⁽⁷⁹⁾, modificado por Truhaut y Vernin ⁽⁸⁰⁾ para la determinación de la acetilcolinesterasa en sangre total. La valoración de la actividad colinesterásica en la sangre y en el suero, se mide la acetilcolina residual no

hidrolizada, presente en la muestra analizada. Esta medición se basa en la reacción del grupo éster de la acetilcolina con la hidroxilamina en medio alcalino, con la consiguiente ruptura de éste enlace para producir al ácido acetilhidroxámico y su sal sódica correspondiente. Este derivado, forma un complejo rojo-púrpura soluble en presencia de cloruro férrico y de un medio fuertemente ácido. La intensidad de la coloración final obtenida, es proporcional a la concentración de acetilcolina residual, no hidrolizada durante la reacción, haciendo posible su cuantificación por métodos fotocolorimétricos o espectrofotométricos a una longitud de onda de 540 nm. Metodología: se agregaron 370 μl de tampón barbital sódico de pH 7,4 a los tubos 1 (muestra control) y 2 (muestra problema). Al tubo blanco (blanco de reactivos), se le agregó 770 μl de tampón barbital sódico de pH 7,4. Posteriormente, se agregaron 20 μl de la sangre de los peces control y la sangre de los peces expuestos a la ACR, al tubo 1 y al tubo 2, respectivamente; se mezclaron suavemente para evitar la formación de burbujas. Se procedió a agregar 380 μl de la solución de trabajo de cloruro de acetilcolina 4 mM, a los tubos 1 y 2, mezclando por rotación. Luego, se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente (25 °C). Transcurrido el tiempo de incubación, se les agregó rápidamente a cada tubo, incluyendo al blanco de reactivos, 150 μl de hidroxilamina 2M, se mezcló vigorosamente con la finalidad de detener la reacción de hidrolisis catalizada por la AChE, se dejó actuar durante 2 minutos. Luego, se añadió a todos los tubos, en estricto orden: 770 μl de agua destilada, 230 μl de HClO_4 1,8 M y 80 μl de solución ácida de FeCl_3 1%; se mezcló luego de la adición de cada uno de los reactivos mencionados, evitando la formación de burbujas. Posterior a ello, se centrifugaron durante 5 minutos a 2000 rpm. Se realizó la lectura espectrofotométrica del sobrenadante a una longitud de onda de 540 nm. Para calcular la actividad enzimática de la AChE en la sangre del pez

cebra, se utilizó la ecuación de la recta de una curva de calibración, haciendo uso de patrones con concentraciones conocidas, a saber: 0,8; 1,6; 2,4 y 3,2 μM de acetilcolina (81).

Una vez obtenida la ecuación de la recta, $y = mx+b$, se despejó el valor de “x” y se sustituyó el valor de “y” por el valor de Densidad Óptica (DO).

III.e. Evaluación de la neurotoxicidad

III.e.1. Evaluación de la actividad motora en el modelo del pez cebra adulto expuesto a la Acrilamida.

La actividad motora de los peces controles y tratados con la ACR, se evaluó diariamente de manera cualitativa, observando los cambios en la orientación del nado, la movilidad, la velocidad del nado, entre otros. Al octavo día de tratamiento se realizó un video-registro, video.AVI de un 1 minuto de duración del movimiento de los peces adultos; para ello, se colocaron en una cápsula de Petri. Posteriormente, los videos fueron analizados haciendo uso del programa Tracker, el cual permitió calcular la velocidad de desplazamiento, el área del recorrido tanto de los peces controles como de los peces tratados.

III.e.1.2. Evaluación de la actividad motora en el modelo larvario de pez cebra expuesto a la Acrilamida.

Para monitorear la conducta motora de las larvas del pez cebra de 5 dpf, tanto controles como tratadas con ACR, se utilizó un programa de captura de video DP-Controller con el cual se realizaron registros de 1 minuto de duración del movimiento de

las larvas. Se evaluó principalmente la alteración de la función motora, mediante las observaciones de los cambios en la coordinación de los movimientos de las larvas tratadas en comparación con el grupo control. Posteriormente, los videos fueron analizados haciendo uso del programa Tracker, el cual permitió calcular el tiempo de desplazamiento, el área del recorrido, facilitando el cálculo de la velocidad del desplazamiento, tanto de las larvas controles como de las larvas tratadas.

III.e.2. Evaluación de las estructuras sensoriales en el modelo larvario del pez cebra expuesto a la Acrilamida.

Para la evaluación de las estructuras sensoriales, como los neuromastomas y los melanóforos, se utilizó la sonda vital de DiOC₁, lo que permitió comparar dichas estructuras en las larvas expuestas a la ACR con las larvas controles, se realizó un registro fotográfico haciendo uso del microscopio de fluorescencia Olympus IX71 con cámara Olympus DP71, a fin de observar las diferencias e identificar las estructuras involucradas que determinan el proceso patológico. Para el análisis de las imágenes se utilizó el programa ImageJ, el cual es un programa de análisis de video e imágenes de dominio público, fácil de utilizar y ejecutar, útil en una gran variedad de sistemas operativos ⁽⁸²⁾.

Sonda DiOC₁: es un marcador fluorescente usado como colorante vital para evidenciar *in vivo* organelos subcelulares con alta afinidad a las mitocondrias. Metodología: este marcador fluorescente se preparó a una concentración final de 0,2 mg/ml ⁽⁷⁵⁾. Se incubaron tanto las larvas tratadas con la CL₅₀ de ACR como las larvas controles con 1000 µl de la sonda fluorescente DiOC₁ en una placa de dosificación tapada durante 1

minuto protegida de la luz; luego de ello, las larvas fueron lavadas en solución de Tyrode y fueron semi-inmovilizadas en una matriz de agarosa (Sigma, Ha-9915) de bajo punto de fusión, preparada al 2%, posteriormente fueron observadas en el microscopio de fluorescencia Olympus IX71, con excitación, 490-500 nm. Se realizaron registros fotográficos de las muestras, los cuales se analizaron a través del programa ImageJ.

III.f. Evaluación histológica en el modelo de pez cebra adulto y larvario expuestos a la Acrilamida.

Para la evaluación de los tejidos, se utilizaron distintas coloraciones histoquímicas e inmunohistoquímicas, afines a estructuras particulares de interés para el presente estudio. Las coloraciones utilizadas en la presente investigación fueron: Hematoxilina-Eosina, Von Kossa, Tricrómico. Además de la técnica de T.U.N.E.L., lo que permitió comparar las estructuras de los organismos expuestos a la ACR con los organismos controles, observando las diferencias e identificando las estructuras involucradas que determinan el proceso patológico ⁽⁷²⁾.

Coloración de Hematoxilina-Eosina: es el método más utilizado en los estudios histológicos. Este método implica el uso de dos colorantes, la hematoxilina la cual es una base que tiñe de color azulado y de manera preferencial los componentes ácidos de las células (ADN, ARN, ribosomas, entre otros). La eosina es un ácido que tiñe de color rosado los componentes básicos de las células (componentes citoplasmáticos). Metodología: los cortes de parafina longitudinales de la porción cefálica de las larvas y los adultos del pez cebra, fueron fijados en paraformaldehído frío al 4% durante dos horas. Posterior a la fijación, las muestras fueron desparafinadas con xilol puro e

hidratadas con una batería de alcoholes en concentraciones decrecientes: 100%, 70%, 50%, 30% hasta llegar al agua destilada, dejando la preparación en contacto con el alcohol por 5 minutos. Luego, se tiñó con la hematoxilina por inmersión de las muestras en una cubeta contentiva del colorante durante 1 minuto, seguido de lavados con: agua corriente durante 15 minutos. Se colocó la preparación en agua destilada durante 1 minuto y luego en etanol al 80% durante 2 minutos. Se sumergió la preparación rápidamente en eosina 2 dip (movimiento rápido de sumergir en segundos). Posteriormente se deshidrataron las muestras en una batería de alcoholes en concentraciones crecientes: 30%, 50%, 70% y 100% dejando la preparación en contacto con el alcohol durante 5 minutos. La eliminación de los restos de parafina y el montaje de las muestras se realizaron con xilol para su observación al microscopio ⁽⁸³⁾.

Tinción de Von Kossa: es una tinción argéntica, que hace uso de la plata para modificar selectivamente el color o la apariencia de un tejido. Es una técnica frecuente de tinción en histología, se utiliza para revelar detalles extremadamente finos de depósito minerales. Es un método de sustitución del calcio por la plata. El nitrato de plata interactúa produciendo fosfato de plata o carbonato de plata. Al unirse a la parte aniónica de las sales de calcio, genera un compuesto de color amarillo, que al ser expuesto a la luz solar o luz artificial adquiere un color negro debido a la reducción de la plata. En los tejidos, el núcleo y el citoplasma presentarán una coloración roja y rosada, respectivamente. Metodología: se desparafinaron las muestras con xilol puro e hidrataron con una batería de alcoholes en concentraciones decrecientes: 100%, 70%, 50% y 30% y finalmente se enjuagaron con agua destilada, dejando la preparación en contacto con el alcohol durante 5 minutos. A continuación, se colocaron las

preparaciones en la solución de nitrato de plata al 5%, manteniéndose en contacto con las muestras durante 1 hora, se evitó la exposición a la luz. Transcurrido el tiempo de reacción, las muestras se enjuagaron con agua destilada y se colocaron en una solución fotográfica reveladora durante 2 minutos. Posteriormente, se lavaron las preparaciones con agua destilada, seguidamente se sumergieron durante 5 minutos en tiosulfato de sodio; luego se lavaron con agua corriente durante 2 minutos y se colocaron las muestras en el colorante rojo núcleo durante 5 minutos para contrastar. Se lavaron nuevamente las preparaciones con agua corriente durante 2 minutos. Seguidamente se deshidrataron y aclararon las muestras con alcohol etílico 95%, alcohol absoluto y xileno dejando las muestras en contacto con el alcohol durante 2 minutos cada uno, procedimiento que se repitió dos veces. Finalmente se montaron las preparaciones con un medio resinoso para su observación microscópica ⁽⁷²⁾.

Tinción Tricrómico: es una técnica de tinción especial para visualizar el tejido conectivo mediante las fibras de colágeno tipo I, que forma las gruesas fibras o haces de colágeno existentes en los áreas extracelulares y estromas orgánicos; también permite evidenciar aunque en menor intensidad, las fibras reticulares (colágeno tipo III). Estos elementos poseen afinidad por los colorantes ácidos debido a su riqueza en grupos fuertemente catiónicos dependientes de los aminoácidos que componen la cadena polipeptídica ⁽⁷²⁾. Se emplean tres colorantes para diferenciar el núcleo celular, el citoplasma y las fibras de colágeno; por tanto se observan el tejido conectivo verde, eritrocitos anaranjados, núcleo celular pardo oscuro a negro mientras que el citoplasma y las fibras musculares son rojo pardo. Metodología, se siguió el protocolo descrito en el kit Masson-Goldner (Merck): se desparafinaron las muestras con xilol puro. A

continuación, se colocaron las preparaciones en la solución de hematoxilina férrica incubándose durante 5 minutos a temperatura ambiente; luego de ello, las muestras se lavaron con agua corriente durante 5 minutos. Posteriormente, se les agregó ácido acético al 1% incubándose durante 30 segundos; seguido a ello se colocó la solución de azofloxina para cubrir la preparación incubándose durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se escurrieron las láminas portaobjetos y se les colocó nuevamente ácido acético al 1% durante 30 segundos. Se agregó la solución de ácido fosfotungstácico-anaranjado G manteniéndose en contacto con la preparación durante 1 minuto, seguidamente se escurrieron las láminas portaobjetos y se agregó el ácido acético al 1% durante 30 segundos. Luego de ello, se colocó el tercer colorante, la solución de verde luz SF incubándose durante 2 minutos y se elimina el resto de la solución. Se procedió a agregar el ácido acético al 1% durante 30 segundos. Posteriormente se deshidrataron las muestras haciendo uso de una batería de alcoholes en concentraciones crecientes: 30%, 50%, 70% y 100% dejando la preparación en contacto con cada alcohol durante 2 minutos. La eliminación de los restos de parafina y el montaje de las muestras se realizaron colocando las muestras en xilol para su observación al microscopio.

Técnica de T.U.N.E.L: es una coloración inmunohistoquímica. Esta tinción se fundamenta en evidenciar la fragmentación del ADN en las células apoptóticas incorporando moléculas marcadoras fluorescentes. La presencia de muescas en el ADN pueden ser identificadas por la desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT), una enzima que cataliza la adición de dUTPs que son secundariamente etiquetados con un marcador fluorescente y que puede también marcar a las células que han sufrido daños en el ADN⁽⁸⁴⁾. Metodología, se siguió el protocolo del kit The DeadEnd™ Colorimétrico

(Promega). *Pre-tratamiento de las muestras:* se desparafinaron las muestras con xilol durante 5 minutos, luego sumergieron las muestras en etanol al 100% durante 5 minutos; posteriormente se hidrataron con una batería de alcoholes en concentraciones decrecientes: 100%, 95%, 85%, 70%, 50% dejando la preparación en contacto con cada alcohol por 3 minutos. Seguidamente se sumergió la preparación en solución de cloruro de sodio al 85% durante 5 minutos y luego en buffer fosfato salino pH 7,4 (PBS) durante 5 minutos. *Detección de apoptosis:* se fijaron las preparaciones en paraformaldehído al 4% en PBS durante 15 minutos, luego se lavaron en PBS durante 5 minutos; se permeabilizó el tejido agregando 100 µl de una solución 20 µg/ml de proteinasa K e incubando a temperatura ambiente durante 10-30 minutos. Seguidamente se sumergió en PBS durante 5 minutos; se repitió la fijación en paraformaldehído al 4% en PBS durante 5 minutos, luego se lavó en PBS durante 5 minutos. Se agregó 100 µl de tampón de equilibrado a cada muestra incubándose a temperatura ambiente durante 5-10 minutos. A continuación, se agregó 100 µl de la mezcla de reacción de TDT a las preparaciones de tejidos, evitando que los cortes de tejidos se secaran por completo; se cubrieron las preparaciones con láminas cubreobjetos de plástico asegurando una distribución uniforme de la mezcla; luego de ello, se incubaron las preparaciones durante 60 minutos a 37 °C en una cámara húmeda. Transcurrido este tiempo se detuvo la reacción, removiendo la lámina cubreobjetos y sumergiendo la preparación en una solución 2X de cloruro de sodio en citrato de sodio (SSC) durante 15 minutos. Seguidamente se lavó tres veces en PBS durante 5 minutos. Se sumergieron las muestras en peróxido de hidrógeno al 0,3% durante 3-5 minutos, realizar 3 lavados con PBS durante 5 minutos. Agregaron 100 µl de estreptavidina HRP (peroxidasa de rábano marcada con estreptavidina) diluida 1:500 en PBS, luego se incubaron a temperatura ambiente

durante 30 minutos. Posteriormente se lavaron 3 veces en PBS durante 5 minutos. Para visualizar la reacción, se agregó 100 μ l de la solución diaminobenzidina (DAB), preparado inmediatamente antes de su uso, se dejó actuar hasta la aparición de un fondo marrón claro, evitando que el fondo de la preparación se tornara demasiado oscuro; seguidamente se sumergió varias veces la preparación en agua desionizada. Finalmente, se colocaron las preparaciones en un medio de montaje acuoso o permanente y se observó la tinción en un microscopio de luz.

III.g. ESTADÍSTICA

Mediante estadística descriptiva se estimaron la media, desviación estándar por el Método de Spearman-Kärber, y ANOVA para el cálculo de las diferencias significativas con un 95% de confianza.

IV RESULTADOS

IV.a. Toxicidad de la Acrilamida en pez cebra adulto

IV.a.1. Concentración letal media (CL_{50}) de Acrilamida en modelo experimental de pez cebra adulto.

La evaluación del efecto de la ACR sobre el pez cebra adulto permitió obtener los datos para la construcción de la relación concentración-respuesta (Tabla V). Al representar gráficamente el porcentaje de la mortalidad versus la concentración de ACR se apreció el comportamiento sigmoideo de la respuesta tóxica, mortalidad acumulada, en las poblaciones expuestas a dicho xenobiótico, evidenciándose que el porcentaje de mortalidad de los peces incremento de manera dependiente de las concentraciones empleadas de ACR (Fig. 25).

Tabla V. Datos para la construcción de la curva concentración-respuesta, Método Probit.

Concentración de ACR (mM)	Logaritmo de la Concentración	Número de peces expuestos (n)	Número de peces muertos (r)	Porcentaje de mortalidad (p)	Probit Empírico (PE)
0,2	-0,70	7	0	0	0
0,4	-0,40	7	0	0	0
0,6	-0,22	7	2	29	4,45
0,8	-0,10	7	6	86	6,08
1,0	0	7	7	100	10,0
3,0	0,48	7	7	100	10,0
5,0	0,70	7	7	100	10,0

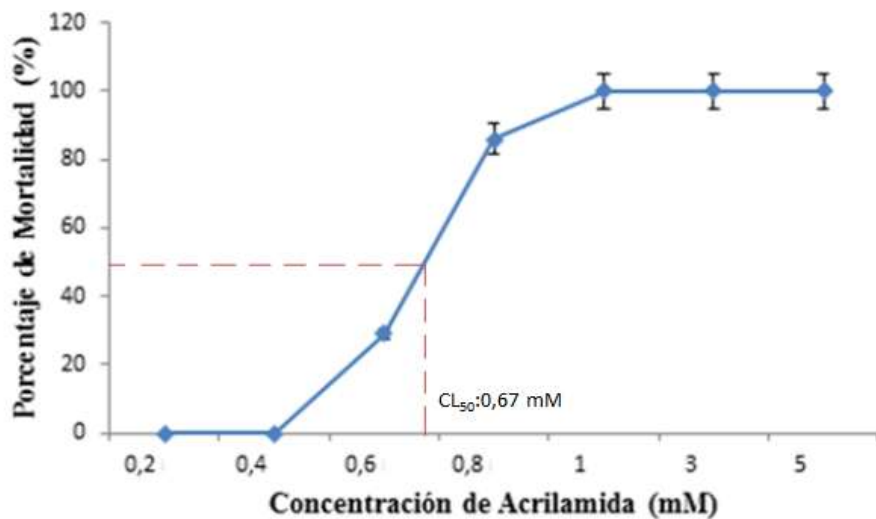


Fig. 25. Relación entre el porcentaje de mortalidad en peces cebra adultos y la concentración de acrilamida. Exposición crónica.

Los datos acá obtenidos permitieron aplicar la transformación Probit, con lo cual se hace lineal la relación concentración-respuesta previamente determinada. Se apreció buena correlación entre ambas variables evaluadas (Fig. 26).

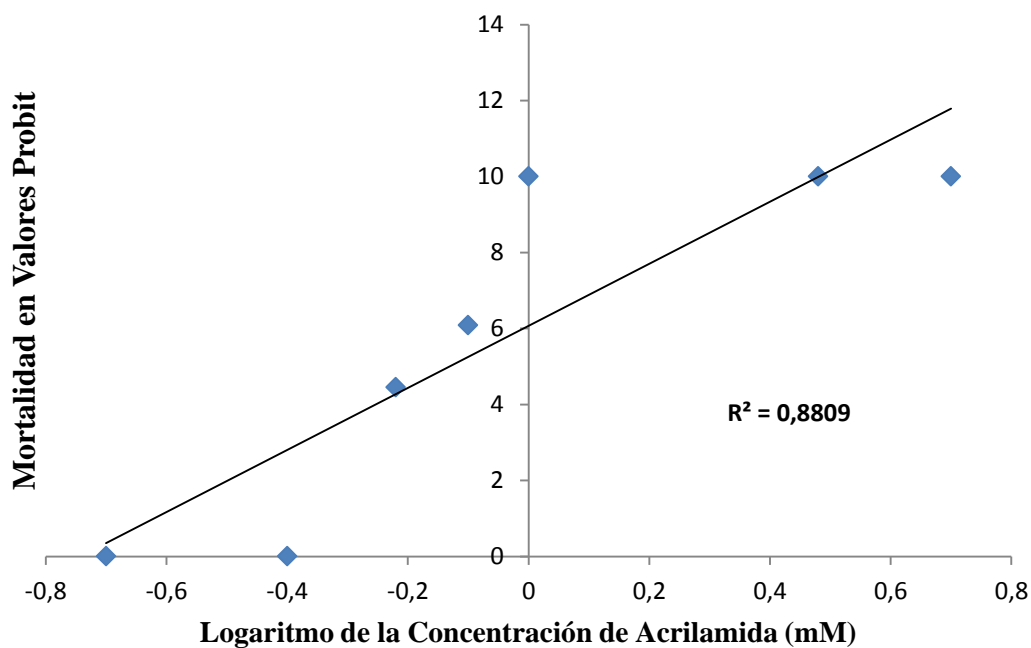


Fig. 26. Relación del porcentaje de mortalidad de peces cebra adultos y la concentración de Acrilamida en valores Probit. Se destaca la correlatividad (R^2).

Una vez conocida la correlación positiva entre el porcentaje de mortalidad y la concentración de ACR, se procedió a determinar la concentración letal media (CL₅₀) de la ACR a través del Método de Spearman-Kärber (Tabla VI).

Tabla VI. Datos para la determinación de la CL₅₀ por el Método de Spearman-Kärber.

Concentración de Acrilamida (mM)	Número de peces muertos	Tasa de Mortalidad	Fracción acumulada de peces muertos
0,2	0	0	0
0,4	0	0	0
0,6	2	0,29	0,29
0,8	6	0,86	1,15
1,0	7	1,00	2,15
X₁ = 1,0		S₁ = 2,15	S₂ = 3,59

Para determinar la concentración letal media (CL₅₀), se sustituyeron los valores en la siguiente ecuación:

$$CL_{50} = X_k - d (S_1 - 1/2)$$

$$CL_{50} = 1,0 - 0,2(2,15 - 1/2)$$

$$\mathbf{CL_{50} = 0,67 \text{ mM}}$$

Ahora bien, luego de obtener la CL₅₀, se calculó la Desviación Estándar (S_m), para ello se sustituyeron los valores en la siguiente ecuación:

$$S_m = d \sqrt{2(S_2) - S_1 - (S_1)^2 - (1/12)}$$

$$S_m = 0,2 \sqrt{2(3,59) - 2,15 - (2,15)^2 - (1/12)}$$

$$\mathbf{S_m = 0,11}$$

Para obtener un intervalo de confianza del 95% en el cálculo de la CL₅₀, se multiplicó el resultado de S_m por el factor de 1,645, teniéndose ahora el siguiente valor:

$$\mathbf{0,11 \times 1,645 = 0,18}$$

Por tanto:

$$CL_{50} = 0,67 \text{ mM} \pm 0,18 \text{ mM}$$

De esta manera quedó establecida la CL_{50} en $0,67 \pm 0,18$ mM para la población de pez cebra adulto tras 8 días de tratamiento con ACR.

Una vez determinada la CL_{50} de ACR, se procedió a la realización de los bioensayos con el tratamiento crónico de la población pez cebra adulta.

IV.a.2. Variación del peso en peces cebra tratados con Acrilamida.

Al monitorear el peso en los peces tratados, se determinó una tendencia a la pérdida progresiva del mismo hasta el 5to día (120 horas) de tratamiento, luego de ello se registró un aumento variable del peso. Adicionalmente los peces tratados comenzaron a presentar edema generalizado, puntos de petequias principalmente en el área abdominal. Se puede observar de manera gráfica el monitoreo del peso tanto en los peces controles como en los tratados durante los 8 días de exposición a la ACR (Fig. 27).

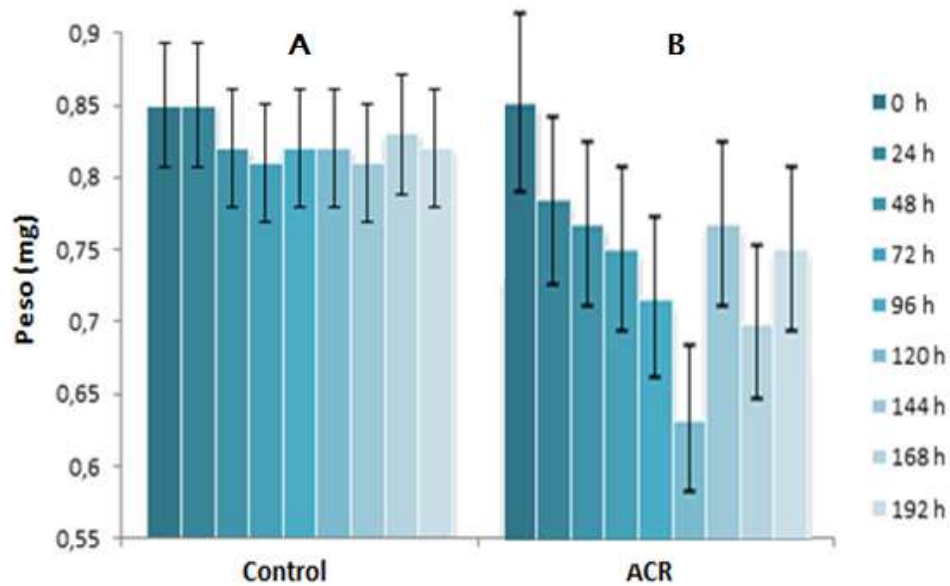


Fig. 27. Gráfica de la relación del Peso (mg) vs. Tiempo (horas) durante 8 días de tratamiento con CL_{50} de ACR. **A)** Peso promedio de los peces controles ($0,83 \pm 0,02$ mg). **B)** Peso promedio de los peces tratados con la ACR ($0,79 \pm 0,04$ mg). Se representa la media (\bar{x}) \pm desviación estándar (DS).

Con los datos obtenidos se calculó el peso promedio del grupo control, siendo de $0,83 \pm 0,02$ mg, manteniéndose el peso dentro de un rango constante con una variabilidad menor al 5% al pasar de los días. En el caso de la población de peces expuestos a la ACR se registró un peso promedio de $0,80 \pm 0,04$ mg, evidenciándose una variación significativa del mismo, disminuyendo en más de un 15% al quinto día de tratamiento; posteriormente se registró un aumento variable en los días restantes de exposición.

IV.a.3. Actividad motora en peces cebra expuestos a la Acrilamida.

Se evaluaron las características de la orientación del nado, el área de desplazamiento y la velocidad de movimientos. A través del análisis de videos, se obtuvo que el área de desplazamiento de los peces controles se mantuvo sobre los $4,27 \text{ mm}^2$ con una velocidad de nado de $3,56 \text{ mm/s}$ y movimientos serpenteantes (Fig.28 a-b).

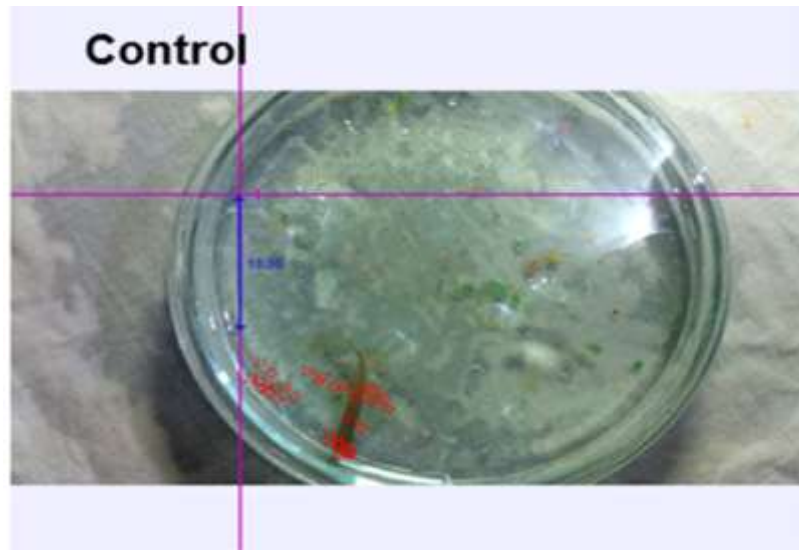


Fig. 28 a. Plano de referencia del movimiento y la orientación de nado del pez control.

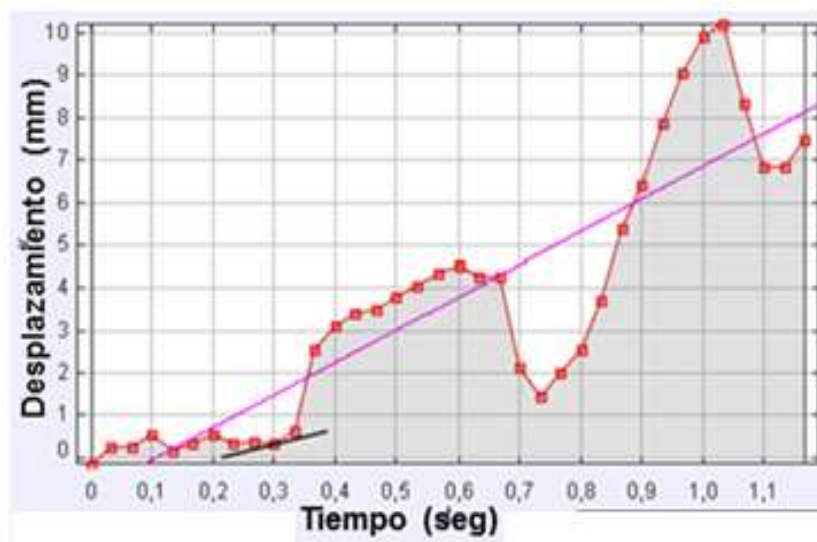


Fig. 28 b. Análisis para determinar el área de desplazamiento y la velocidad de nado del pez control. Obtenido de un valor promedio de 21 peces.

Al evaluar estos parámetros en los peces tratados con la ACR, se obtuvo un área de desplazamiento de $1,26 \text{ mm}^2$ correspondiéndose con una velocidad de $1,05 \text{ mm/s}$, por tanto, se evidenció una reducción del área de desplazamiento así como de la velocidad de nado y ausencia de movimientos serpenteantes con nado desorientado (Fig. 29 a-b).

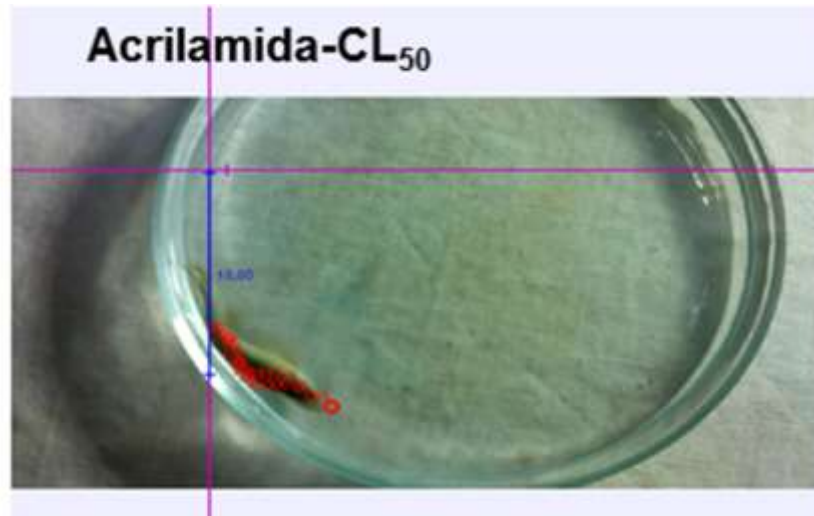


Fig. 29 a. Plano de referencia del movimiento y la orientación de nado del pez tratado.



Fig. 29 b. Análisis para determinar el área de desplazamiento y la velocidad de nado del pez tratado. Obtenido de un valor promedio de 21 peces.

A partir del análisis de los gráficos, se determinó una reducción significativa de más del 70% en la velocidad de nado de los peces tratados con ACR con respecto a los peces control.

IV.a.4. Morfología del tejido sanguíneo de peces cebra expuestos a la Acrilamida.

Se observó en la sangre de los peces controles glóbulos rojos ovalados, nucleados, uniformemente teñidos de rosa con núcleo azul-violeta tal y como se describe en la literatura; por su parte, los glóbulos rojos en la sangre de los peces tratados con ACR mostraron pérdida parcial de la forma ovalada al ser más redondos, hipocromía de dos cruces (2+) y alteración de la morfología nuclear al comparar con la sangre de peces controles (Fig.30 a-b). Al evaluar las características nucleares de dichas células sanguíneas se logra apreciar una fusión y/o fragmentación nuclear en los eritrocitos de peces tratados con ACR que no se corresponde con lo observado en el grupo control (Fig. 30 a`-b`).

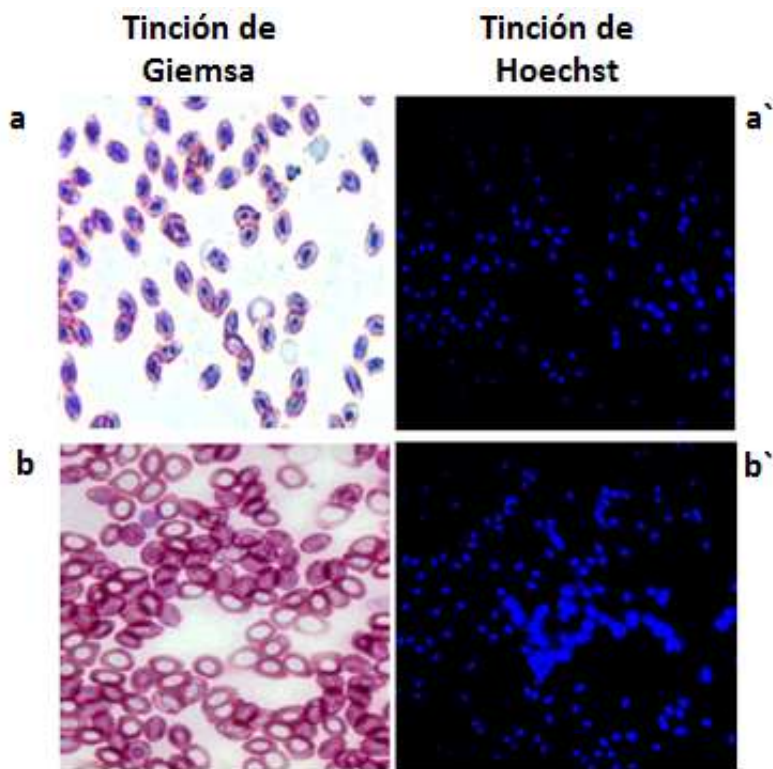


Fig. 30 **A**. Frotis de sangre periférica de peces controles. Tinción de Giemsa (**a**) y Sonda de Hoechst (**a`**). **B** Frotis de sangre periférica de peces tratados con ACR. Tinción de Giemsa (**b**) y Sonda de Hoechst, se aprecia fusión nuclear (**b`**).

IV.a.5. Hemoglobina del pez cebra expuesto a la Acrilamida.

En la sangre de peces control se observó la separación de la hemoglobina (Hb) en tres bandas claramente definidas tal y como se ha descrito en la literatura; con respecto a la sangre de los peces tratados con ACR se evidenció la separación de la Hb en cuatro bandas (Fig. 31). Al realizar un análisis de la densidad a las bandas de la Hb de ambos grupos, se logra confirmar la presencia de una cuarta banda sólo en la sangre de la población tratada con ACR, de migración lenta (Fig. 32).

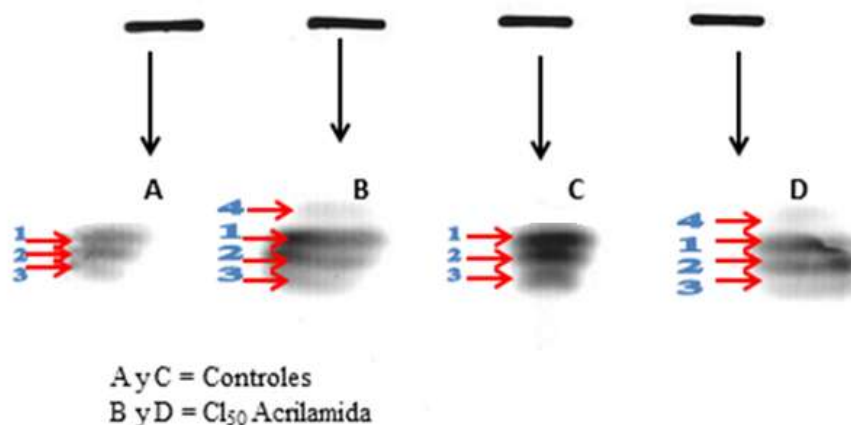


Fig. 31. Bandas de Hemoglobina (Hb) de peces cebra controles y tratados con acrilamida.

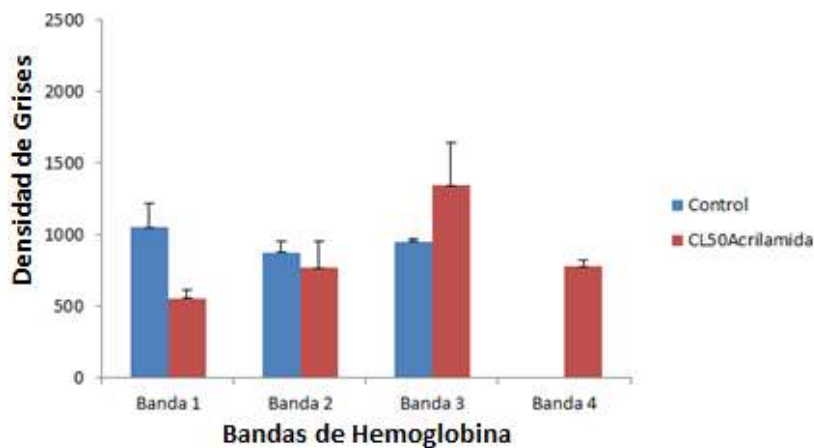


Fig. 32. Representación gráfica de la densidad según el Programa ImageJ de las bandas de la hemoglobina de los peces controles versus la hemoglobina de los peces tratado con acrilamida.

Al comparar las bandas obtenidas, se observa que las bandas en la hemoglobina en los peces tratados son más anchas y con densidad variables con respecto a las bandas de la hemoglobina en los peces controles.

IV.a.6. Actividad de la enzima Ácido δ -aminolevulínico dehidratasa (ALAD).

Previo a la ejecución del protocolo para determinar la actividad de la enzima ALAD se obtuvo la medición del hematocrito tanto de la población control como de la población tratada con ACR, siendo de 4% y 5% respectivamente. Las lecturas de las densidades ópticas obtenidas a 550nm (Tabla VII) permitieron calcular la actividad de la enzima ALAD.

Tabla VII. Lectura de Densidad Óptica a 555 nm para determinar la actividad de la enzima ALAD.

Tipo de muestra	Densidad óptica (555 nm)	Actividad ALAD del Control	Actividad ALAD de Muestra
Blanco de Control	0,17	-	
Control	0,24	0,70 U/ml de GR	
Blanco de Muestra	0,20		-
Muestra	0,27		0,56U/ml de GR

De acuerdo con los datos, la actividad de la enzima ALAD en los peces controles fue de 0,70 unidades de ALAD/ml de GR; mientras que la actividad de esta enzima en los peces tratados con ACR fue de 0,56 unidades de ALAD/ml de GR evidenciándose una reducción del 20% en la actividad de esta importante enzima.

IV.a.7. Actividad de la enzima Acetilcolinesterasa (AChE).

Se realizó una curva de calibración a partir de patrones conocidos de acetilcolina, para determinar la actividad de esta enzima tanto en peces control como en peces

tratados, los resultados de la curva obtenida a 540 nm (Tabla VIII), al representar gráficamente los datos, se obtiene la ecuación de la recta y se muestra alta correlatividad de las variables evaluadas (Fig. 33).

Tabla VIII. Datos de la curva de calibración para la determinar la actividad de la enzima AChE.

Concentración de Acetilcolina (μM)	Densidad óptica (540 nm)
0,8	0,120
1,6	0,226
2,4	0,270
3,2	0,406

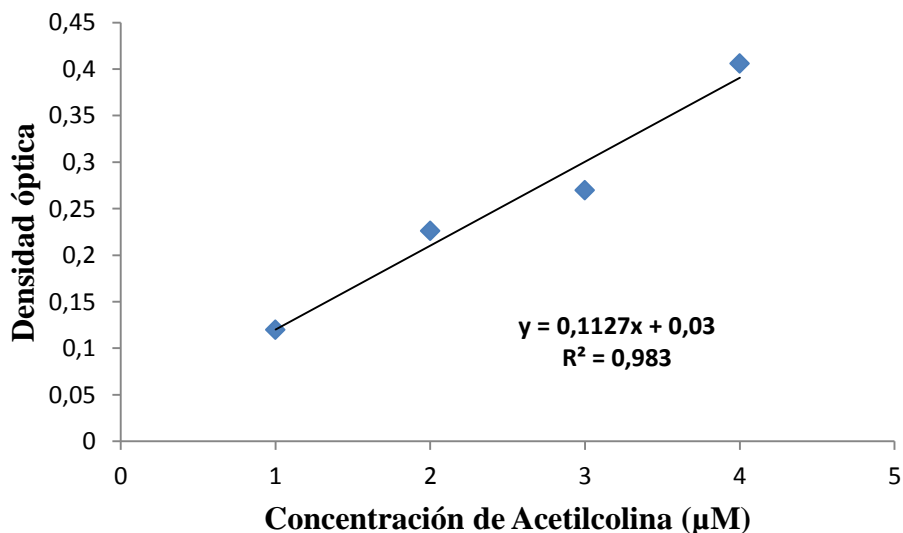


Fig. 33. Curva de Calibración para la determinación de la actividad de la Acetilcolinesterasa. Se Destaca la ecuación de la recta y la alta correlatividad (R^2) entre las variables.

Para obtener la actividad de la AChE se determinó la densidad óptica tanto del control como de la muestra tratada con ACR y a su vez los valores arrojados se

sustituyeron en la ecuación de la recta (Y), para determinar la correspondiente actividad de la colinesterasa.

Muestra Control

Densidad óptica (DO) del control = DO control – DO blanco

$$\text{DO del control} = 0,36 - 0,20 = \mathbf{0,16}$$

Sustituyendo en la ecuación $Y = 0,1127x + 0,03$ y despejando el valor de X:

$$X = \frac{\mathbf{0,16} - 0,03}{0,1127}$$

$$0,1127$$

$$\text{Actividad de la AChE en sangre control} = \mathbf{1,15 \mu M}$$

Muestra Tratada con ACR

Densidad óptica (DO) de la muestra = DO muestra – DO blanco

$$\text{DO de la muestra} = 0,30 - 0,20 = \mathbf{0,10}$$

$$X = \frac{\mathbf{0,10} - 0,03}{0,1127}$$

$$0,1127$$

$$\text{Actividad de la AChE en sangre tratada} = \mathbf{0,62 \mu M}$$

Al comparar la actividad colinesterásica entre ambos grupos experimentales, se logra evidenciar una reducción significativa del 46% de la actividad de la AChE en la sangre de peces tratados con ACR con respecto al control.

IV.a.8. Estructuras sensoriales en el pez cebra expuesto a la Acrilamida.

IV.a.8.1. Efecto sobre los melanóforos.

Al evaluar el color en las bandas del pez cebra, se evidencio una marcada reducción en la coloración de las bandas características del pez cebra en la población tratada con ACR principalmente en las porciones abdominal y caudal con respecto a los peces control (Fig. 34 a-b).

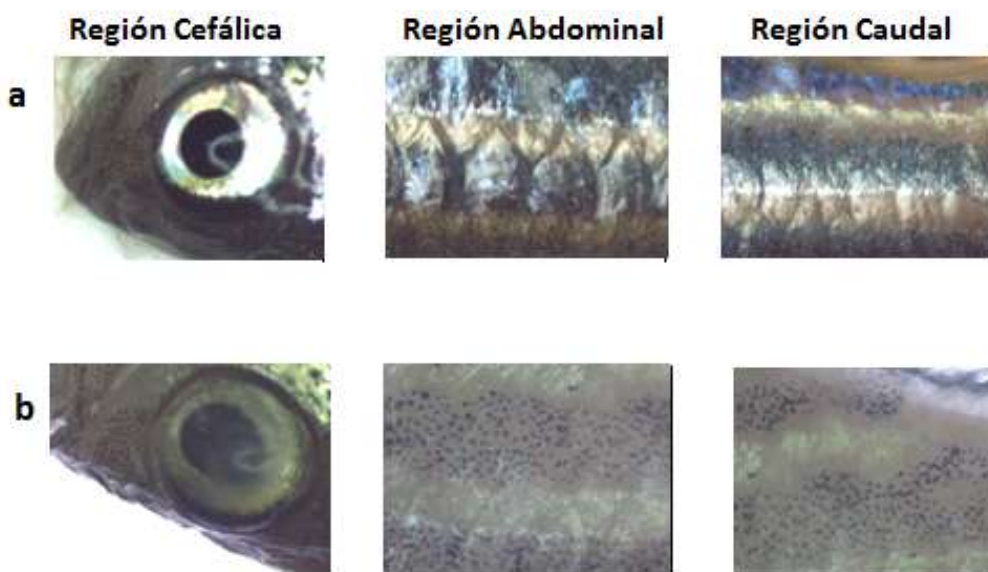


Fig. 34. Efecto de la acrilamida sobre los melanóforos en el pez cebra adulto. Se muestra pez control (a) y pez tratado (b).

IV.a.9. Tejidos en pez cebra expuesto a la Acrilamida.

La evaluación histológica de los tejidos de la población de peces tratados con la CL_{50} de ACR, permitió registrar cambios importantes en los tejidos renal, hepático e intestinal con respecto a la población controles. En el tejido renal control, se observó un parénquima conservado presentando las estructuras tubulares características de este órgano (Fig. 35a); por su parte, en los peces tratados con ACR, se observó pérdida de la

arquitectura renal típica (Hematoxilina-Eosina), asociado con una disminución de las fibras colágeno (Tricrómico) y una aparente disminución de los depósitos de Ca^{2+} (Von kossa) (Fig. 35b). Adicionalmente se apreció una reacción de T.U.N.E.L. positiva en la población tratada (Fig. 35c).

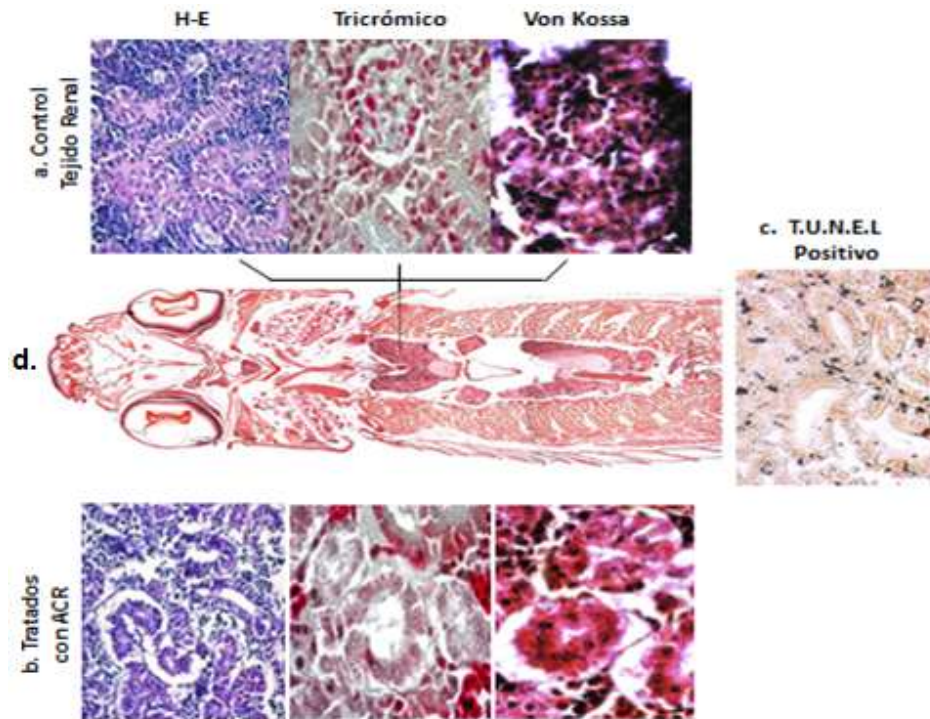


Fig. 35. Efectos de la acrilamida sobre el parénquima renal, tejido hematopoyético. (a) Tejido de pez cebra control. (b) Tejido de pez cebra tratado. (c) Reacción positiva con la Técnica de T.U.N.E.L. (d) Corte transversal señalando ubicación del tejido renal. H-E: Hematoxilina-Eosina.

Al evaluar el tejido hepático, en los peces control se apreció la estructura clásica del hepatocito organizado alrededor de una vénula central (Fig. 36a), mientras que en los peces tratados se determinó un severo cambio en el parénquima hepático caracterizado por la presencia de estructuras vacuolares (Hematoxilina-Eosina), vinculado con la posible reducción en los depósitos de calcio (Von Kossa) y una alteración en las fibras

colágenas (Tricrómico) (Fig. 36b). Se evidenció una reacción de T.U.N.E.L. positiva en la población tratada (Fig. 36c).

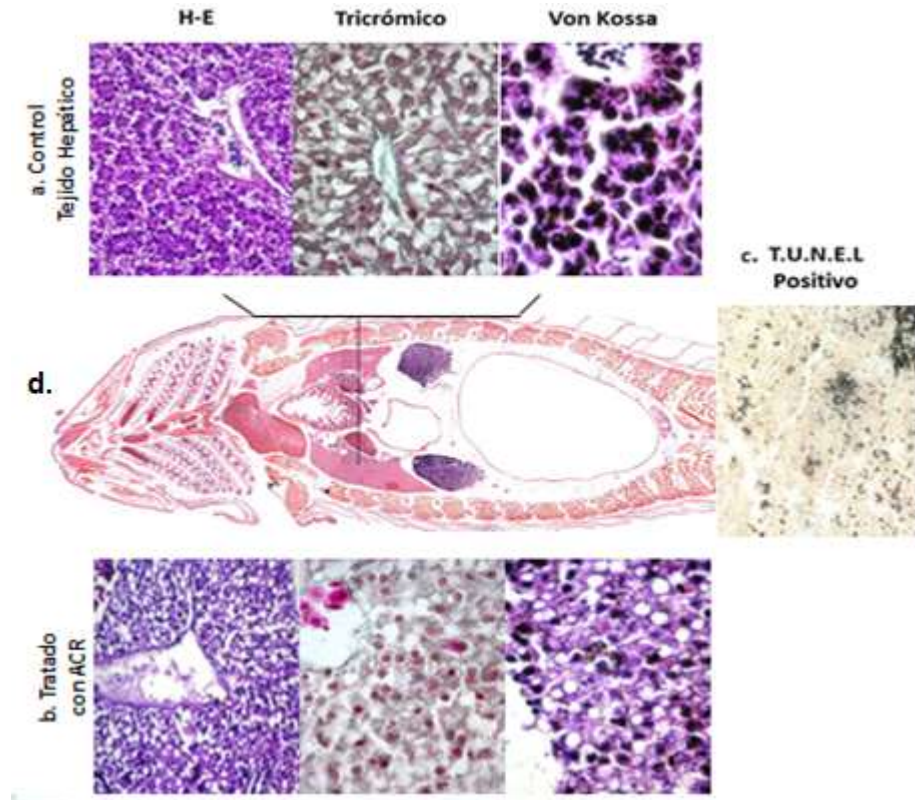


Fig. 36. Efectos de la acrilamida sobre el parénquima hepático. (a) Tejido de pez cebra control. (b) Tejido de pez cebra tratado. (c) Reacción positiva con la Técnica de T.U.N.E.L. (d) Corte transversal señalando ubicación del tejido hepático. H-E, tinción Hematoxilina-Eosina.

En cuanto al tejido intestinal, se registró adelgazamiento de las asas del epitelio de absorción e hiperplasia de las células caliciformes en los peces tratados con ACR al compararlos con el grupo de peces control (Fig. 37 a-b).

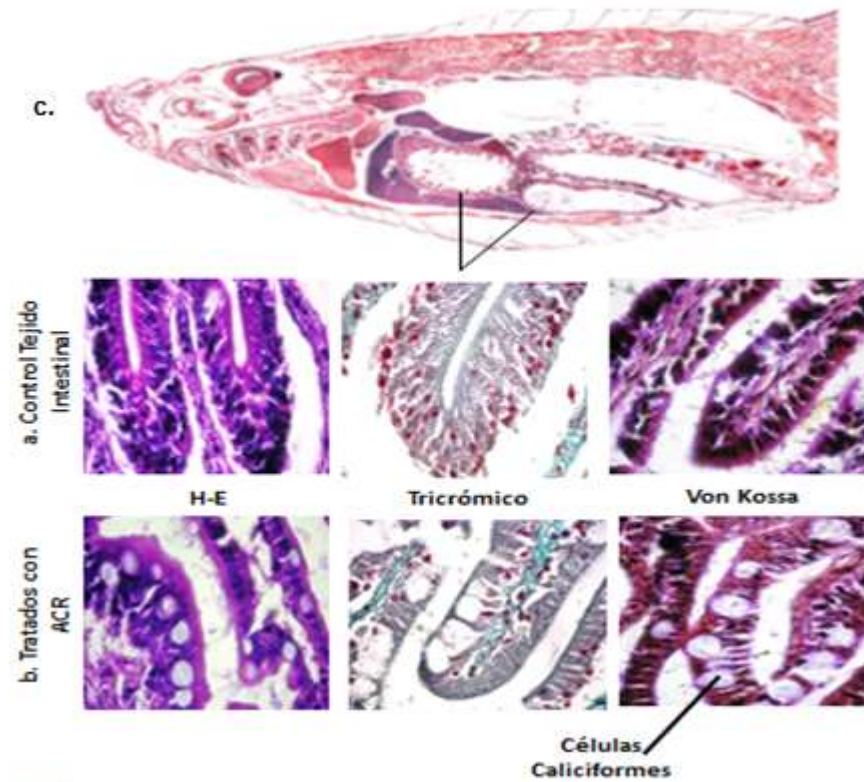


Fig. 37. Efectos de la acrilamida sobre el tejido intestinal. (a) Tejido de pez cebra control. (b) Tejido de pez cebra tratado. Se destacan las células caliciformes hipertróficas. (c) Corte longitudinal señalando la ubicación del tejido intestinal. H-E, tinción Hematoxilina-Eosina.

IV.b. Toxicidad de la Acrilamida en larva de pez cebra

IV.b.1. Concentración letal media (CL_{50}) de Acrilamida en modelo larvario de pez cebra.

La evaluación del efecto de la ACR sobre la población larvaria de pez cebra, permitió obtener una gráfica de comportamiento sigmoideo (Fig. 38), a la cual se le aplicó la transformación Probit (Fig. 39) y el mismo tratamiento estadístico del modelo adulto, determinándose una alta correlatividad (R^2) entre las variables de mortalidad acumulada en porcentaje en el eje de la ordenada (Y), y la concentración de ACR ($\mu\text{g/ml}$) en el eje de la abscisa (X). La concentración letal media (CL_{50}) en la población

larvaria fue de $240 \pm 30 \mu\text{g/ml}$. Observándose como principal manifestación de toxicidad la curvatura troncal.

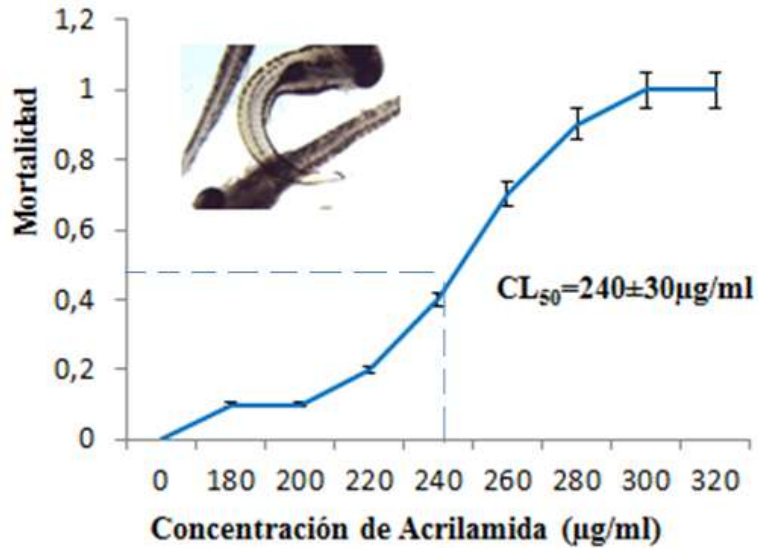


Fig. 38. Relación entre la concentración y respuesta de la letalidad de acrilamida. Tratamiento de 24 horas sobre larvas de pez cebra. Se resalta la CL₅₀ con intervalos de confianza de 95% así como el efecto de curvatura troncal (ImageJ).

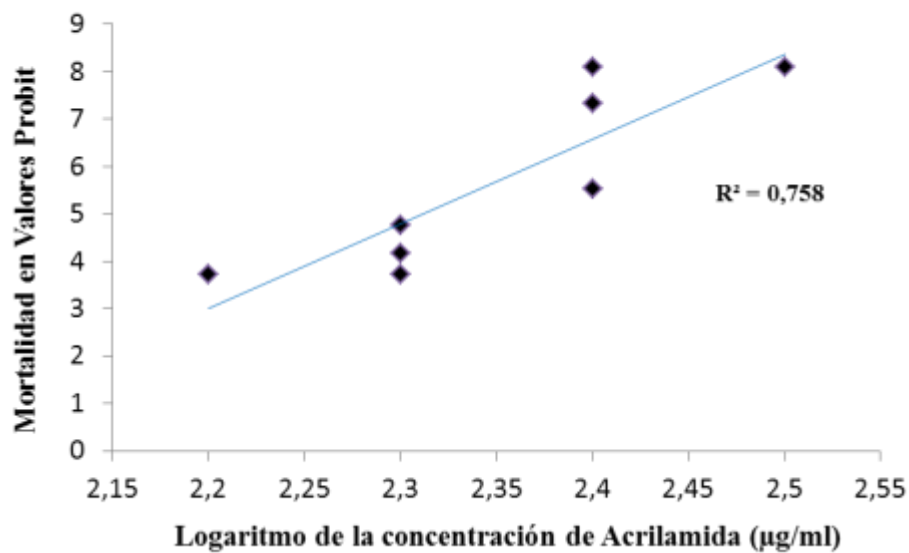


Fig. 39. Relación entre la concentración de acrilamida y el porcentaje de mortalidad en transformación Probit. Se destaca la correlatividad R² de la relación.

IV.b.2. Cambios morfológicos en larvas de pez cebra expuestas a la Acrilamida.

Al evaluar macroscópicamente el efecto de la ACR sobre las larvas, se observaron señales características de toxicidad como lo son la curvatura troncal y el edema pericárdico. La toxicidad a la ACR fue dependiente de la concentración, debido a que se evidenció a la CL₅₀₊ (270 µg/ml) presencia tanto edema pericárdico como de curvatura troncal; mientras que a menor concentración CL₅₀₋ (210 µg/ml) sólo se apreció el edema pericárdico (Fig. 40).

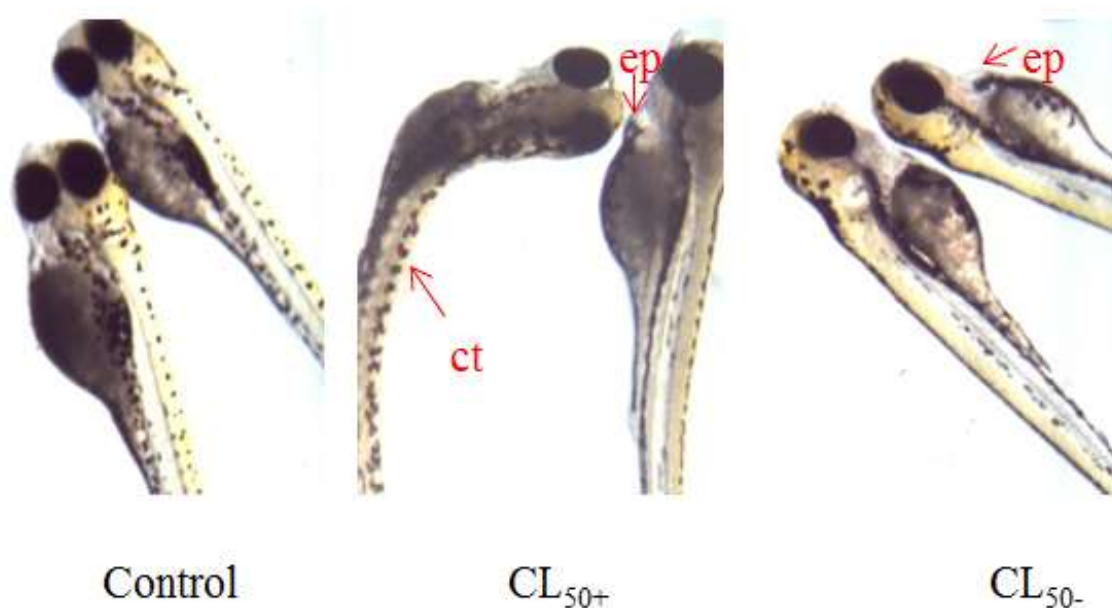


Fig. 40. Señales de la acción tóxica de la acrilamida en larvas de pez cebra: curvatura troncal (ct) y edema pericárdico (ep). CL₅₀₊ (270 µg/ml), CL₅₀₋ (210 µg/ml).

IV.b.3. Actividad motora en larvas de pez cebra expuestas a la Acrilamida.

En el registro de la actividad motora de las larvas control se observaron desplazamientos rápidos con movimientos corporales serpentinos. Por su parte, en las larvas tratadas con ACR, se registró un desplazamiento reducido con ausencia de

movimientos curvilíneos, siendo predominante los movimientos rectos. Al realizar el análisis de los videos se logró evidenciar que el área de desplazamiento de las larvas control fue de $1,98 \text{ mm}^2$ con una velocidad de nado de $3,90 \text{ mm/s}$ (Fig. 41a), mientras que en las larvas tratadas el área de desplazamiento fue de $1,12 \text{ mm}^2$ con una velocidad de nado $2,24 \text{ mm/s}$ (Fig. 41b); esto represento una disminución del 57% de la velocidad de desplazamiento en las larvas tratadas con respecto a las larvas control.

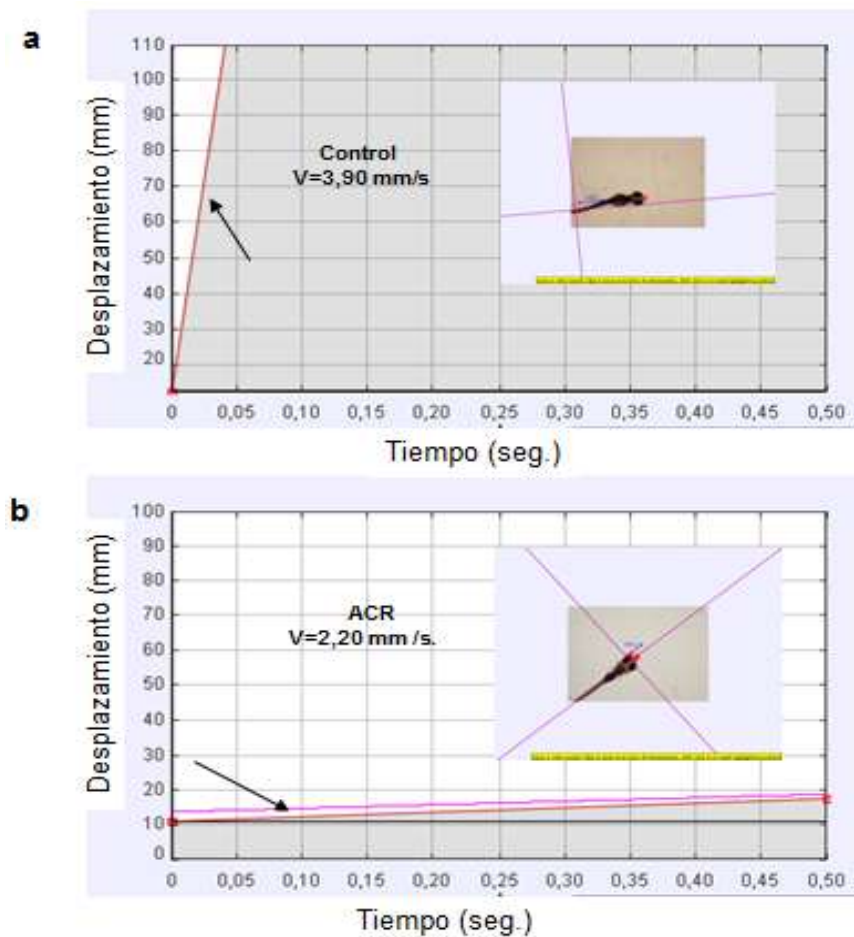


Fig. 41. Registro del análisis del área de desplazamiento y velocidad de nado de la larva control (a) y de la larva tratada con acrilamida (b). Se destaca la pendiente del área de desplazamiento (flechas). Se muestra imagen del plano de referencia del desplazamiento de la larva en cada caso. Datos obtenidos del valor promedio de 30 larvas.

VI.b.4. Actividad de la Ácido δ -aminolevulínico dehidratasa (ALAD).

Se determinó la actividad óptica de la enzima ALAD en macerado larvario. Observándose la coincidencia de los dos picos de absorbancia a 468 nm y a 643 nm determinados en la sangre de peces adultos controles.

IV.b.5. Estructuras sensoriales en larvas expuestas a la Acrilamida.

Al evaluar la morfología de estructuras sensoriales, especialmente los neuromastomas del sistema de línea lateral (Fig. 42a), se observaron en las larvas controles los neuromastomas como puntos de emisión verde fluorescente intensa (Fig. 42b). Con el análisis de la densidad se ponen en evidencia estas estructuras sensoriales como puntos negros de alta densidad con característico arreglo a manera de rosetas (Fig. 42 b'-b"). En las larvas tratadas con ACR, se registró una reducción en la intensidad de la fluorescencia verde (Fig. 42 c). Corroborándose con la evaluación de la densidad una reducción significativa de los neuromastomas, visualizándose como puntos negros de menor intensidad con pérdida de la organización de estas células ciliadas (Fig. 42 c'-c").

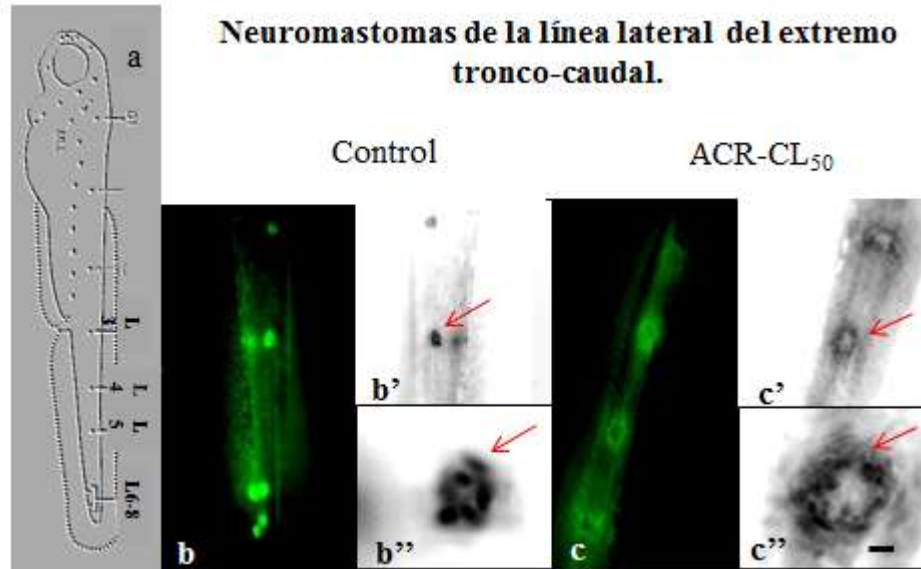


Fig. 42. Daño inducido por la acrilamida sobre los neuromastomas evaluados mediante el marcaje con sonda DiOC₁ y técnicas de análisis de imágenes por inversión. Se destacan los neuromastomas del extremo tronco-caudal de la línea lateral. (a) Esquema gráfico se destacan: neuromastomas L3, L4, L5 y L6-8. (b) Control. (b'-b''), análisis de densidad. (c) Tratadas con ACR, se destaca el desarreglo y micro nucleación de las células sensoriales que conforman el neuromastoma (c'-c''). Escala de la barra 10µm aplicada a todos los paneles.

IV.b.5.1. Efecto sobre los Melanóforos.

Se registraron cambios en los melanóforos, de manera particular en los melanóforos de la porción céfalo-dorsal. En ese sentido, en las larvas controles los melanóforos se evidenciaron como células estrelladas, de gran densidad y alto contenido de melanina (Fig. 43a-b). Al evaluar estas estructuras en las larvas tratadas con ACR, se observaron melanóforos con un mayor número de proyecciones citoplasmáticas, menor densidad y menor presencia de melanina (Fig. 43a'-b'). Dicha alteración morfológica fue dependiente de la concentración de ACR; a mayor concentración (CL₅₀₊) se evidenció una transformación de las células estrelladas hacia células redondeadas.

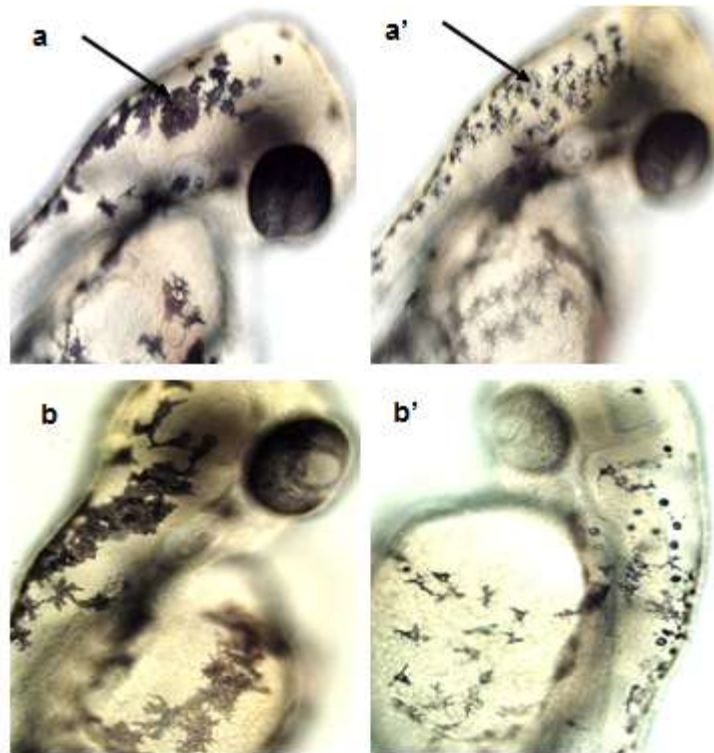


Fig. 43. **a-b** Melanóforos de larvas control, se destaca la forma estrellada de dichas células (flechas). **a'-b'** melanóforos de larvas tratadas con 210 µg/ml de ACR (a') y 270 µg/ml de ACR (b'), los efectos son dependientes de la concentración.

IV.b.6. Actividad de las Transaminasas (AST/ALT) en larvas expuestas a la Acrilamida.

Se evaluó la actividad de la Aspartato Amino Transferasa (AST) y de la Alanino Amino Transferasa (ALT), en macerado larvario. Encontrándose un aumento en la actividad de ambas transaminasas en las larvas tratadas con respecto al grupo control. El aumento de la AST se dio en mayor proporción que el aumento de la ALT, dicha elevación de la actividad enzimática fue dependiente de la concentración de ACR (Fig. 44).

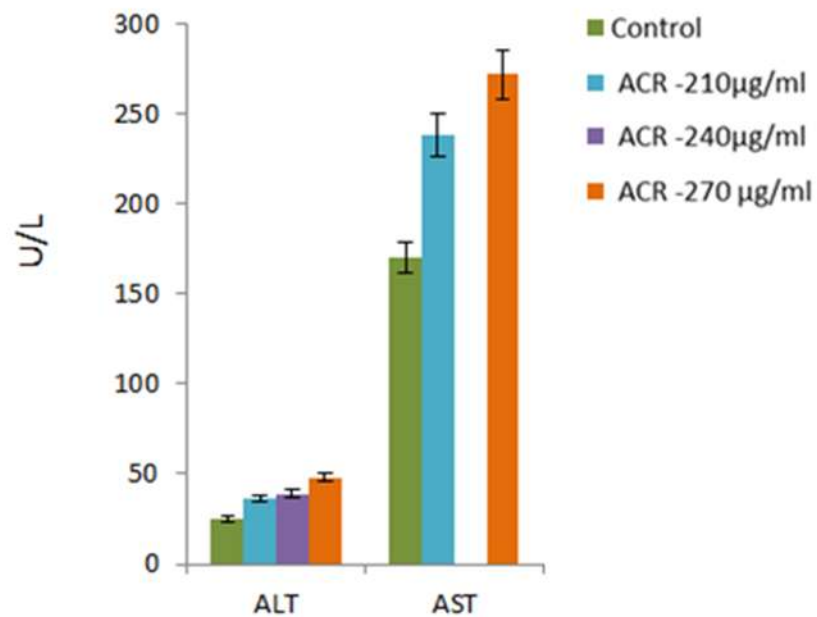


Fig. 44. Actividad enzimática de las transaminasas en larvas tratadas con la CL_{50} de acrilamida (210µg/ml, 240µg/ml y 270µg/ml) y en larvas controles. Se muestra la media (\bar{x}) \pm desviaciones estándar (DS).

V DISCUSIÓN

El modelo experimental de pez cebra tanto adulto como larvario, permitió demostrar el efecto tóxico y el posible mecanismo involucrado en las alteraciones asociadas a la acción de la ACR. Se puso en evidencia la acción Hemato-Neurotóxica inducida por este agente químico, debido a que los órganos blancos son el tejido hematopoyético y las estructuras de los órganos sensoriales, dicho efecto resultó ser dependiente de la concentración y del tiempo de exposición a la ACR.

V.a. Relación concentración-respuesta a la Acrilamida.

La relación concentración-respuesta, analizada a través del estudio de la correlación entre la mortalidad de los organismos expuestos y las distintas concentraciones ensayadas, permitió predecir la toxicidad asociada a la ACR como un efecto dependiente de la concentración y del tiempo de exposición, además de obtener la concentración letal media (CL_{50}), así como las concentraciones sub-letal y supra-letal medias, CL_{50-} y CL_{50+} respectivamente. Como un efecto dependiente de la concentración, el análisis de dicha relación, permitió definir, una mortalidad diferencial. El efecto diferencial, en cuanto a la sensibilidad a la ACR, ha sido interpretado como un evento vinculado a la base genética de los individuos e independiente de sus mecanismos inmunológicos⁽²³⁾. Estudios realizados en otros modelos experimentales, tal como roedores, refieren la existencia de una sensibilidad a la ACR dependiente del sexo y de la edad del organismo expuesto, siendo más propensos a la intoxicación los ratones hembras y las ratas más jóvenes^(39,66). Cabe destacar que la sensibilidad descrita en el presente estudio, proviene de una población aleatoria de machos y hembras jóvenes por

lo que no ha sido posible establecer si el efecto registrado concuerde o no con la observación de otros autores.

En cuanto a la acción dependiente del tiempo de exposición a la ACR, el análisis de dicha relación, permitió evidenciar, con la CL_{50} -, una variación dinámica en el peso corporal. En tal sentido, el tratamiento crónico sobre la población adulta expuesta permitió poner en evidencia: a) una tendencia a la disminución significativa durante las primeras 120 horas y b) un leve incremento durante las 72 horas restantes del tratamiento; esto vinculado con la presencia de edema abdominal.

En otros modelos experimentales, han referido reducción inicial de peso corporal, encontrándose que nuestros hallazgos coinciden con los datos aportados por otros investigadores en el modelo experimental de rata. Los mismos, han descrito una reducción significativa del 33.6% del peso, en ratas tratadas con ACR luego de 14 días de exposición por ingesta oral ⁽⁸⁵⁾. Otro estudio, sobre una población de ratas juveniles, tratadas igualmente de manera crónica con ACR, demostró una reducción significativa de la ganancia de peso corporal, luego de 21 días de tratamiento ⁽³⁷⁾. Adicionalmente, se ha referido un descenso importante en el peso de las crías de ratas y ratones a consecuencia del suministro de ACR durante la gestación ⁽⁸⁾. Es importante destacar que durante el tratamiento crónico con ACR en el presente estudio, la población de peces se mantuvo alimentada de forma continua; por lo que dicha pérdida de peso corporal pudo ser debido a la falta de ingesta del alimento vinculada a una acción directa de la ACR sobre la sistémica del animal, más que a un déficit en la disponibilidad del alimento. Particularmente, su acción sobre la sistémica del epitelio de absorción intestinal así lo ha sugerido. En tal sentido, la hiperplasia de las células caliciformes intestinales podría

alterar la producción de mucina necesaria para la lubricación y protección de la mucosa intestinal contra el quimo ácido proveniente del estómago, lo que pudiera ser traducido como una alteración de la digestión y una reducción en la absorción de nutrientes. Cabe destacar, que la acción tóxica de la ACR ha sido vinculada con la presencia de enteropatías ⁽⁸⁶⁾.

Respecto al leve incremento de peso en las últimas etapas del tratamiento con ACR, resultado no reportado hasta el momento por otros autores, cabe destacar el fenómeno del edema abdominal asociado a ello. Como es sabido, la formación del edema, se encuentra íntimamente asociado a una disminución de la presión oncótica o a un incremento de la presión hidrostática del sistema vascular, posiblemente a consecuencia de la alteración morfo-funcional de órganos metabolizantes, tales como el hígado y el riñón ⁽⁸⁷⁾. En nuestro modelo experimental, la acción de la ACR sobre las células del parénquima hepático, vinculada con un daño estructural, como lo mostrado en la investigación, podría estar comprometiendo la función de síntesis de proteínas como la albúmina, lo cual se traduciría en una hipoalbuminemia que promovería la disminución de la presión oncótica y por tanto la salida de líquido hacia el intersticio o hacia cavidades del organismo, con la formación del edema a nivel abdominal. Por otra parte el daño reportado sobre el parénquima hepático, podría estar interviniendo la actividad de otras moléculas hepato-específicas como son las enzimas transaminasas, las cuales permiten definir la funcionalidad del hepatocito. En ese sentido, el aumento de la ALT así como el aumento en mayor proporción de la AST, nos definen en el modelo larvario la hepatotoxicidad de la ACR. En cuanto a la mayor actividad de la AST posiblemente pueda tener su origen en la ubicuidad de esta enzima, al encontrarse

principalmente en hígado y en proporción variable en corazón, riñón, páncreas e incluso en los eritrocitos ⁽⁸⁸⁾. Ambas enzimas permiten así la evaluación más específica de la funcionalidad del parénquima hepático ⁽⁸⁸⁾. Es relevante destacar que, la hepatotoxicidad vinculada con la ACR podría también estar comprometiendo otros procesos hepáticos como son la detoxificación y el metabolismo de diversos xenobióticos, lo que estaría, posiblemente favoreciendo, debido a una mayor biodisponibilidad de la ACR, la acción crónica de este agente tóxico en el organismo.

En cuanto a la acción de la ACR sobre las células del parénquima renal, vinculada con un daño estructural, como se ha mostrado en la presente investigación, pudiera estar contribuyendo a través de dos vías con la formación del edema. En ese sentido, la disminución de la función de excreción renal conllevaría a una mayor retención de líquido, favoreciendo así el incremento de la presión hidrostática vascular, con la consecuente formación del edema. Por otra parte, se pudiera afectar la selectividad de la barrera de filtración glomerular, con la consecuente pérdida de proteínas plasmáticas, lo que favorecería la disminución de la presión oncótica vascular, generando así la formación del edema. Cabe destacar, que éste compromiso del parénquima renal podría conllevar a la disfunción de diversos procesos metabólicos, entre ellos la menor excreción de la ACR y sus metabolitos, lo que contribuiría al aumento de la vida media y por ende a la mayor biodisponibilidad de éstos en el organismo, lo que se traduce en concentraciones elevadas de ACR y/o sus metabolitos, exacerbando así el daño inducido.

Es relevante destacar que el daño evidenciado en la presente investigación sobre la sistémica renal y hepática inducido por la ACR, coincide con los resultados

reportados por otros investigadores, que hacen uso, igualmente, del modelo de peces⁽⁸⁹⁾. Los mismos, vinculan las características de la toxicidad de la ACR con procesos de apoptosis tal como lo avalan nuestros resultados. Dichas evaluaciones del efecto de la ACR, particularmente sobre el parénquima hepático, en peces de colores (*Carassius auratus*), han definido una alteración hepatocelular eosinofílica difusa con respuesta inflamatoria severa. Además los hepatocitos han sido mostrados con inclusiones rojizas, presumiblemente causadas por la acumulación de actina o de sus productos de degradación. Otros tejido de relevancia analizado, por los mismos autores, ha sido el parénquima pancreático, no evaluado en nuestra investigación. Sin embargo, cabe destacar que los investigadores reportan infiltración difusa de macrófagos, conteniendo cuerpos irregulares de pigmentos similares a la lipofucsina, lo que ha sugerido una respuesta de muerte celular mediada probablemente por apoptosis⁽⁸⁹⁾.

Otros investigadores, han definido la toxicidad de la ACR vinculada al incremento del estrés oxidativo con la consecuente producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)⁽⁸⁵⁾. En ese sentido, se ha descrito que la ACR puede reducir significativamente los equivalentes reductores como el NADPH, el glutatión, la vitamina E entre otros, cambiando el equilibrio celular hacia la oxidación^(28,85). Con estos datos es posible inferir que el estrés oxidativo posiblemente podría contribuir al desarrollo de la apoptosis asociada con la toxicidad de la ACR.

El análisis de la acción de la ACR sobre los sistemas renal y hepático, entre otros tejidos, expuesto hasta el momento, ha permitido sugerir que la toxicidad de la ACR sea considerada como un fenómeno de acción multiorgánica. Esta afección multisistémica, podría estar vinculada con la característica de alta reactividad de la ACR con los

residuos cisteína, así como también residuos lisina y valina presente en la mayoría de las proteínas ^(90,91).

V.b. Hematotoxicidad inducida por la Acrilamida.

La hematotoxicidad inducida por acrilamida, ha sido asociada por numerosos autores con la formación de aductos entre la ACR y la molécula de hemoglobina ⁽²⁸⁾. Nuestros resultados así lo corroboran. En este sentido, se destaca la aparición de una cuarta banda de alta densidad en la Hb de los peces tratados con ACR, vinculada con la expresión del aducto. Este hallazgo, concuerda con lo reportado por otros autores ⁽⁹²⁾, lo que ha permitido sugerir una modificación de la estructura terciaria de esta globulina, y probablemente el compromiso de la funcionalidad de la misma. Con respecto al cambio de la estructura terciaria de la Hb, dicho cambio podría estar vinculado con la acción directa de la ACR sobre su estructura, particularmente a través de la alta reactividad con grupos valina terminales, lo que generaría el denominado aducto hematotóxico, que pudiese modificar la afinidad de la Hb por la molécula de oxígeno. En ese sentido, cabe destacar que ha sido reportada una buena correlación entre los niveles de formación de los aductos ACR-Hb y los efectos neurotóxicos vinculados a la ACR ⁽³⁰⁾.

Por otra parte, el compromiso de funcionalidad de la molécula de Hb podría ser interpretado como una consecuencia de la acción de la ACR sobre enzimas reguladoras de su biosíntesis, tal como la ALAD. Dicha interpretación ha sido sugerida por nuestros resultados. Al respecto, la disminución en la actividad de la ALAD, descrita en el presente estudio, pudiese estar vinculada con la reactividad nucleofílica entre la ACR y los grupos sulfhidrilos presentes en el sitio catalítico de esta enzima, siendo éste un

mecanismo de aducción que inhibe su actividad, de manera similar a lo reportado en los caso de intoxicaciones por metales pesados como el plomo ^(28,33,53). Esta alteración de la funcionalidad enzimática conllevaría a una disminución en la síntesis de la molécula de Hb, lo que pone en evidencia la gran relevancia de la actividad de la enzima ALAD, como blanco de la acción hematotóxica de algunos agentes químicos ⁽⁹³⁾, en este caso, un agente químico de procesado como la ACR. En el modelo experimental de pez cebra la afección de vías enzimáticas asociadas a la biosíntesis de la Hb, como la reducción o inhibición total de la actividad de la ALAD, podría estar vinculada con trastornos hematológicos, tipo anemia sideroblástica reportada en peces a través de la manipulación genética por inactivación del gen que codifica la síntesis de la enzima ALAD ⁽⁹⁴⁾. Por otra parte ha sido reportado que también pudiera estar vinculado con la genotoxicidad- dependiente de la ACR, según el reporte de algunos autores ⁽²⁷⁾.

Esta hematotoxicidad inducida por la ACR, a través de la intervención sobre la molécula de Hb, pudiera no sólo comprometer la funcionalidad de esta globulina de transporte, sino también la morfo-funcionalidad de las células que la portan. Al respecto, cabe destacar que la alteración morfológica de las principales células de la unidad morfo-funcional hematopoyética contentiva de esta globulina, como son los eritrocitos, hasta el presente no ha sido claramente establecida. En tal sentido, nuestros resultados de la hematotoxicidad vinculada a la acción de la ACR además de expresar la formación de aductos, quedó puesta en evidencia a través de la hipocromía e hipertrofia de las células rojas, así como la fragmentación nuclear de las mismas, resultados hasta el momento no reportados por otros autores. Estos hallazgos podrían estar asociados a la alta afinidad de la ACR por grupos cisteínicos de las macromoléculas como el ADN nuclear, tal como ha

sido propuesto por algunos investigadores ⁽²⁸⁾. La alteración del núcleo celular, presentado en nuestros resultados, podría comprometer la producción de trifosfato de adenosina (ATP), con lo cual se vería limitado el aporte energético en el eritrocito y por consiguiente la funcionalidad de esta relevante célula sanguínea, también resultaría comprometida ⁽⁵⁰⁾.

Otra evidencia de la hematotoxicidad vinculada con la acción de la ACR, es el daño inducido sobre el parénquima renal, tal como lo avalan nuestros resultados, ya que este órgano actúa como fuente principal del tejido hematopoyético al generar las células sanguíneas de manera similar a la médula ósea generadora de estas células en los vertebrados mamíferos ⁽⁵⁰⁾. En ese sentido, la disfuncionalidad renal no solo comprometería la regulación de las presiones hidrostática y oncótica sistémicas que dieron explicación a la formación del edema, sino que también se vería comprometida la síntesis de las células sanguíneas, principalmente de los eritrocitos lo que podría generar alteraciones hematológicas severas o se pudiese inducir la síntesis de glóbulos rojos anormales que estimulen la apoptosis.

De todos los resultados hasta acá expuesto queda por tanto evidenciada la acción hematotóxica inducida por la ACR, como una afección directa sobre la estructura y funcionalidad del tejido hematopoyético, en donde un proceso de apoptosis pudiera estar siendo estimulado por la formación de aductos hematotóxicos. Por otra parte, cabe destacar que ha sido reportada una buena correlación entre la formación de los aductos hematotóxicos (ACR-Hb) y los efectos neurotóxicos vinculados a la ACR en humanos y roedores expuestos ⁽³⁰⁾.

V.c. Neurotoxicidad inducida por la Acrilamida.

En los humanos la neurotoxicidad inducida por la ACR, ha sido reportada por numerosos autores ^(27,37), como una triada de déficit neurológico, puesta de manifiesto a través de marcha atáxica, debilidad del músculo esquelético y disminución de la fuerza de presión de las extremidades superiores e inferiores ^(36, 37,85). Nuestros resultados corroboran algunos de estos aspectos, ya que la alteración de la actividad motora en el modelo de pez cebra, tanto el adulto como la larva, se pusieron en evidencia a través de la desorientación del sentido de nado y reducción de la velocidad de desplazamiento. Estos hallazgos coinciden con los reportados en otros modelos experimentales como los roedores, en donde la reducción significativa del área de desplazamiento, ha sido asociada con un daño directo sobre la estructura anatómica del tejido cerebral que actúa como base para la regulación y control de la actividad motora y el comportamiento del individuo ⁽⁹⁴⁾. También ha sido asociada con la acción directa sobre la estructura anatómica del citoesqueleto, particularmente, sobre proteínas específicas tales como la tubulina y la actina, cuya función está vinculada con la contracción muscular, necesaria para el adecuado movimiento ⁽⁷⁾. Nuestros resultados se aproximaron a la afección neurotóxica producida por la ACR de manera comparable con los resultados propuestos con otros modelos de experimentación, en donde estructuras anatómicas sensoriales como son los neuromastomas, se vieron afectadas. Particularmente, la modificación estructural de los neuromastomas, reportada en nuestros resultados, podría estar vinculada con la propiedad hidrofílica de la ACR, la cual estaría promoviendo una adhesión de ésta, a las membranas de las terminales nerviosas que conforman los neuromastomas ⁽³⁸⁾. Esta adhesión de la ACR a los neuromastomas, simulada en el

esquema propuesto (Fig. 45), estaría generando una inadecuada captación de los estímulos sensoriales probablemente a través de la desorganización estructural del conjunto de células ciliadas que constituyen a los neuromastomas. Esta situación traería como consecuencia el bloqueo de la mecánica de los cilios de esta estructura sensorial, que según sea la direccionalidad de sus movimientos se estimula o se inhibe la liberación de los neurotransmisores ⁽⁶⁰⁾. La flexión de los cilios (Fig.46), en dirección del largo kinocilio conduce a la despolarización de la célula pilosa, aumentando la tasa de liberación de neurotransmisor en la sinapsis y, por tanto, al aumento de la frecuencia de potenciales de acción en la fibra aferente, favoreciendo la fusión entre las membranas de las vesículas contentivas de los neurotransmisores y las membranas de las células sensoriales, con la correspondiente liberación de los neurotransmisores y por tanto una adecuada transmisión de los estímulos, como lo han reportado algunos investigadores ⁽⁶⁰⁾.

Por otra parte, al inclinarse, en sentido inverso hacia los cilios más cortos, se produciría un potencial de receptor hiperpolarizante, lo que se traduce en la disminución de la frecuencia de potenciales de acción e inhibición de la liberación de neurotransmisores ⁽⁶⁰⁾.

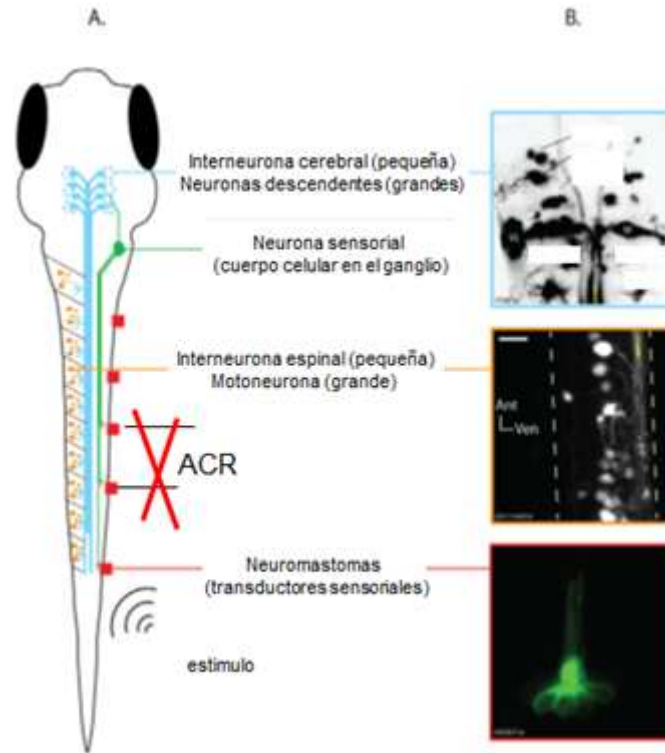


Fig. 45. A: Esquema de posible mecanismo de acción de la acrilamida sobre los neuromastomas en larvas de pez cebra. B: Imágenes de estructuras sensoriales en larvas de pez cebra. Fuente: Stobb y col., 2012, modificado por Hernández C, 2014 ⁽⁹⁵⁾.

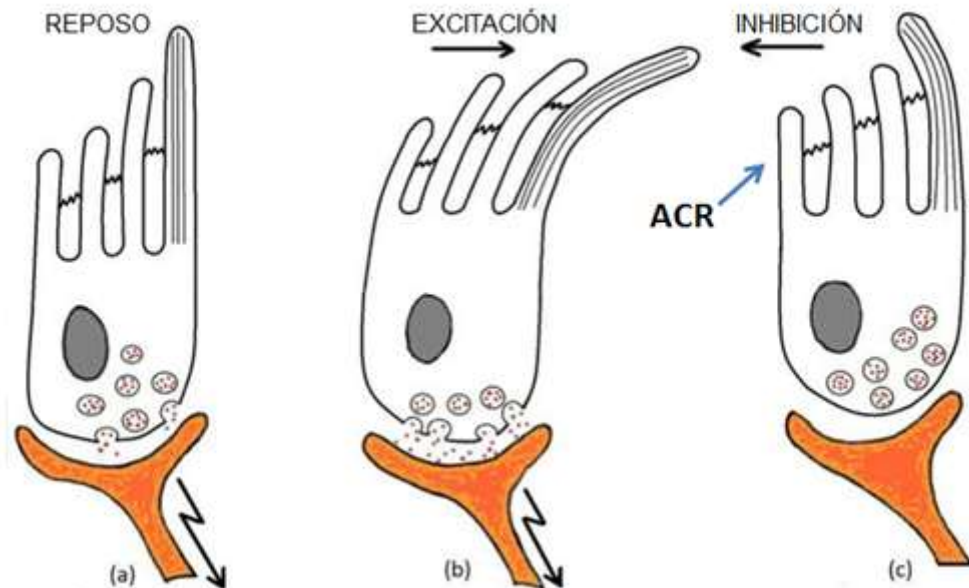


Fig. 46. Esquema de las células ciliadas que muestra el desplazamiento de los cilios frente a distintos estímulos. (a) Célula en reposo; (b) Respuesta frente a estímulo excitatorio, desplazamientos de los kinocilios hacia el largo estereocilio; (c) Inhibición, desplazamiento de cilios hacia el lado opuesto. Fuente: Fernández D, 2006, modificado por Hernández C, 2013 ⁽⁶⁰⁾.

En cuanto a los melanóforos, quedo demostrado que estos, tanto en el modelo adulto como en el larvario, resultaron estructuras sensoriales sensibles a la acción tóxica de la ACR. Al respecto, cabe destacar que la ACR, bien sea por la reacción de su grupo carboxilo (-COO) con grupos de aminoácidos tales como valina o cisteína, estableciendo enlaces fuertes de tipo aducto de hemoglobina; o la reacción de su grupo amino (-NH₂), con las cabezas de fosfolípidos, tales como grupos carboxilos de cerebrósidos de membrana, define la reactividad de esta molécula ⁽⁹⁰⁾. La sensibilidad de las estructuras sensoriales reportada en la presente investigación y caracterizada por la pérdida en la coloración de las bandas pigmentadas del pez cebra adulto y la larva, podría por tanto estar vinculada, por una parte, a la acción directa de la ACR sobre grupos cisteínicos de proteínas tipo miosina o actina del citoesqueleto del melanóforo o debido a una acción indirecta a través interacciones débiles con grupos de proteínas constituyentes del soporte natural del melanóforo como es la musculatura esquelética. En ambos casos, podría estar comprometiéndose la función principal de estas células responsables de la pigmentación como es el proceso de agregación o dispersión de los gránulos de la melanina, que promueven la variabilidad cromática, como una respuesta a estímulos ambientales y a su vez podría también verse comprometido el mecanismo de contracción-relajación, lo que definiría la disfuncionalidad de los melanóforos reportada en nuestra investigación en los peces adultos y larvas expuestas a la ACR.

V.d. Actividad de la Ácido δ -aminolevulínico dehidratasa (ALAD) y de la Acetilcolinesterasa (AChE).

Estudios proteómicos, tanto *in vivo* como *in vitro*, han permitido demostrar que la ACR por su naturaleza química, al igual que otros alquenos tipo 2, puede alterar la

función de diversas proteínas, debido a su alta aducción electrofílica con residuos de cisteína específicos en las proteínas celulares ^(28,90). Cabe destacar que los residuos cisteínicos de las triadas catalíticas poseen grupos tioles o sulfhidrilos (-SH) altamente nucleófilos que regulan la actividad de múltiples enzimas, al actuar como aceptores para modular la interacción redox o al participar directamente en la actividad catalítica de dichas proteínas ⁽⁹⁰⁾. Por lo tanto, podría ser evidente que la aducción de la ACR con los grupos sulfhidrilos tendría implicaciones sustanciales para la función de la proteína y la toxicidad subsiguiente. En ese sentido, nuestros resultados avalan la inhibición que ejerce la ACR sobre la actividad de proteínas con actividad catalítica, como son las enzimas ALAD y AChE, lo que podría traducirse en un aumento de las concentraciones por acumulación de los sustratos de las mismas o en la disminución de la concentración de los productos de la acción biocatalizadora de ambas proteínas.

Respecto a la enzima ALAD se ha descrito que como resultado de la disminución de su actividad no sólo se inhibe la síntesis de la Hb a consecuencia de la menor disponibilidad del porfobilinógeno; sino también se podría acumular su sustrato, el ácido δ -aminolevulínico, el cual posee similitud estructural con el ácido γ -aminobutírico, por lo que podría estimular a los receptores de éste a nivel del sistema nervioso, contribuyendo posiblemente a exacerbar los mecanismos de neurotoxicidad, como ha sido reportado en el caso de intoxicaciones plúmbicas ⁽⁵³⁾. Este mecanismo de acción vinculado a la disfuncionalidad de la ALAD ha permitido inferir que la acumulación de su sustrato podría contribuir indirectamente en el desarrollo de la neurotoxicidad asociada con la exposición a la ACR.

Respecto a la enzima AChE se ha descrito que como resultado de la disminución de su actividad se podría exacerbar el efecto tóxico sobre el sistema nervioso, al existir mayor biodisponibilidad del neurotransmisor estimulante acetilcolina. Esto ha permitido sugerir una posible degeneración neuronal significativa tras la exposición crónica a la ACR ⁽³⁹⁾. Cabe destacar, que esta enzima se ubica a nivel del tejido nervioso así como en los eritrocitos y en las uniones neuro-musculares ⁽⁹⁶⁾, lo que se traduce en la existencia de diferentes isoenzimas. En tal sentido, a diferencia de la isoenzima del tejido cerebral, se ha reportado que la actividad de la colinesterasa sérica es mucho más sensible a la acción de los inhibidores ⁽⁹⁶⁾. Particularmente, nuestros resultados coinciden con tal aseveración, como lo sugiere una disminución significativa en la actividad de la AChE sérica de los peces tratados con ACR.

Estos hallazgos ponen en evidencia la sensibilidad de macromoléculas proteicas del tipo ALAD y AChE como consecuencia de la acción de la ACR, lo que podría entenderse como una modulación negativa de la actividad de dichas enzimas por acción de este alqueno tipo 2. Esta sensibilidad a la ACR podría contribuir a la comprensión de la acción hemato-neurotóxica, propuesta en la presente investigación, ya que probablemente se comprometan las unidades morfo-funcionales del sistema hematopoyético y de los órganos sensoriales, debido a que estas proteínas catalíticas regulan rutas enzimáticas comunes en ambas unidades.

VI CONCLUSIONES

- ❖ La formación de aductos acrilamida-hemoglobina coincide con lo reportado en otros modelos experimentales, lo que ha permitido validar el modelo de pez cebra, siendo evidente que este novel modelo es eficaz en la evaluación de la Hematotoxicidad.

- ❖ La acrilamida induce señales de daño en el sistema hematopoyético como unidad morfo-funcional, evidenciada por: 1) hipocromía e hipertrofia de los eritrocitos, 2) formación de aductos de hemoglobina, 3) disminución de la actividad de la ALAD, 4) apoptosis en las células rojas.

- ❖ La acrilamida altera la función de la mucosa produciendo cambios en la absorción intestinal evidenciados por la pérdida de peso corporal.

- ❖ La acrilamida altera las estructuras de los órganos sensoriales como unidades morfo-funcional evidenciadas a través de: 1) la alteración de la actividad motora 2) desorden estructural en la morfología de los neuromastomas y de los melanóforos.

- ❖ La acrilamida induce daño multisistémico, puesto en evidencia a través del daño a nivel de tejidos como el hepático, el renal e intestinal, asociado con la apoptosis.

- ❖ La acrilamida disminuye la actividad de la AChE sérica.

VII RECOMENDACIONES

En experimentos posteriores se recomienda ensayar concentraciones que permitan establecer la Concentración Tóxica Media (CT₅₀), con la finalidad de establecer si el daño inducido por la ACR es reversible en el tiempo.

VIII BIBLIOGRAFÍA

1. Mayani H. El sistema hematopoyético ante una anemia crónica grave: análisis y reflexiones sobre un modelo experimental. *Rev Hematol Mex* 2012; 13(4):185-194.
2. Salazar-Lugo R, León A y Lemus M. Efecto del cadmio y de la temperatura sobre el conteo de células sanguíneas del pez dulceacuícola *Colossoma macropomum*. *Rev Cient (Maracaibo)* [Revista electrónica] 2009; 19(1):7-14[Consultado el 15 Mar 2014]. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592009000100002&Ing=es.
3. Salazar-Lugo R, Blanco Y, Centeno L y Lemus M. Variaciones en los parámetros hematológicos y en la respuesta inmune inespecífica de la cachama negra *Colossoma macropomum* expuesta a Cadmio. *Saber, Universidad de Oriente* 2011; 23(1):28-35.
4. Ghysen A, y Dambly-Chaudière C. Development of the zebrafish lateral line. *Cur Opin Neurobiol* 2004; 14:67-73.
5. Fernández, D. El desarrollo de la línea lateral en Zebrafish, *Danio rerio* [Artículo en línea] 2012. [Consultado 10 Ene 2013]. Disponible en: <http://desarrollo-pezebra.blogspot.com/>
6. Salim S y Ali S. Melanophores: Smooth Muscle Cells in Disguise. *INTECH* 2012; 7:133-158.
7. Yu SF, Song FY, Yi C, Yang XW, Li GZ, Zhang CL y col. Acrylamide alters cytoskeletal protein level in rat serum. *Biomed Environ Sci* 2013; 26(11):926-29.
8. Elika, Fundación Vasca para la Seguridad Alimentaria. Acrilamida. [Artículo en línea]. 2005. [Consultado 20 Sep 2012]. Disponible en: <http://www.elika.net/datos/riesgos/Archivo5/Acrilamida%202005.pdf>.
9. International Agency for Research on Cancer (IARC). Screening Assessment for the Challenge 2-Propenamide (Acrylamide). 2009; 1-69.
10. World Health Organization in collaboration with the Food and Agriculture Organization of the United Nations WHO/FAO. Consultation on the health implications of acrylamide in food. Geneva 25-27. [Artículo en línea] 2002. [Consultado 10 Oct 2012]. Disponible en: <http://www.who.int/fsf/acrylamide/summaryreportfinal.pdf>
11. García-López A y Alfaro-Macedo M. Acrilamida en alimentos para consumo humano. *Rev Sanid Milit Mex* 2007; 61(6):384-88.

12. Read JG. Acrilamida Trabajo presentado durante el Curso de Toxicología y Química Forense. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales – Universidad de Belgrano, Argentina [Artículo en línea] 2011. [Consultado 24 Oct 2012]. Disponible en: http://www.ub.edu.ar/revistas_digitaless/Ciencias/Vol12Numero2/Articulo_acrilamida.pdf
13. Kesson C M, Lawson D H, Baird A W. Acrylamide poisoning. *Postgrad Med J* 1977; 53:16-17.
14. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological Profile for Acrylamide. [Artículo en línea] 2012. [Consultado 15 Ene 2013]. Disponible en: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp203.pdf>
15. Morales F, Rufián-Henares J, Jiménez-Pérez S. Incidencia de la acrilamida en patatas fritas comercializadas en la comunidad de Madrid. *Alimentaria* 2005; 367:29-35.
16. Shipp A, Lawrence G, Gentry R, McDonald T, Bartow H, Bounds J y col. Acrylamide: Review of Toxicity Data and Dose-Response Analyses for Cancer and Noncancer Effects. *Crit Rev Toxicol* 2006 Jul-Aug; 36(6-7):481-608.
17. Moreno IM, Rubio C, Gutiérrez AJ, Cameán AM, Hardisson A. La acrilamida, contaminante químico de procesado: Revisión. *Rev Toxicol* 2007; 24:1-9.
18. Masson L, Muñoz J, Romero N, Camilo C, Encina C, Hernández L y col. Acrilamida en patatas fritas: Revisión actualizada. [Artículo en línea]. [Consultado 23 Ago 2012]. Disponible en: http://www.captura.uchile.cl/jspui/bitstream/2250/6054/1/Masson_Lilia.pdf
19. Morales F, Arribas G, Jiménez S, Jiménez P, Alarcón E, Borge J y col. Actuaciones sobre la presencia de acrilamida en alimentos comercializados en España. *Alimentaria* 2008; 102-09.
20. Doroshenko O, Fuhr U, Kunz D, Frank D, Kinzig M, Jetter A y col. In vivo Role of Cytochrome P450 2E1 and Glutathione-S-Transferase Activity for Acrylamide Toxicokinetics in Humans. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18(2):433-43.
21. Fennell T, Sumner S, Snyder R, Burgess J, Spicer R, Bridson W y col. Metabolism and Hemoglobin Adduct Formation of Acrylamide in Humans. *Toxicol Sci* 2005; 85:447–59.
22. Wilson K, Bälter K, Adami O, Grönberg H, Vikström A, Paulsson B y col. Acrylamide exposure measured by food frequency questionnaire and hemoglobin adduct levels and prostate cancer risk in the Cancer of the Prostate in Sweden Study. *Int J Cancer* 2009; 124(10):2384-90.

23. Duale N, Bjellaas T, Alexander J, Becher G, Haugen M, Paulsen J y col. Biomarkers of Human Exposure to Acrylamide and Relation to Polimorphisms in Metabolizing Genes. *Toxicol Sci* 2009; 108 (1): 90–9.
24. Fuhr U, Boettcher M, Kinzig-Schippers M, Weyer A, Jetter A, Lazar A y col. Toxicokinetics of Acrylamide in Humans after Ingestion of a Defined Dose in a Test Meal to Improve Risk Assessment for Acrylamide Carcinogenicity. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15:266-71.
25. Vikström AC, Abramsson-Zetterberg L, Naruszewicz M, Athanassiadis I, Granath FN, Törnqvist MA. In Vivo Doses of Acrylamide and Glycidamide in Humans after Intake of Acrylamide-Rich Food. *Toxicol Sci* 2011; 119(1):41–9.
26. Baum M, Bertow D, Fauth E, Thielen S, Zankl H, Eisenbrand G. Toxicology of acrylamide: Concentration-response relationships of acrylamide and glycidamide in human blood. *BLL* 2005; 57-64.
27. LoPachin RM. The Changing View of Acrylamide Neurotoxicity. *Neurotoxicology* 2004; 25:617–30.
28. LoPachin RM, y DeCaprio AP. Protein Adduct Formation as a Molecular Mechanism in Neurotoxicity. *Toxicol Sci* 2005; 86(2):214–25.
29. Mendel Friedman. Chemistry, Biochemistry, and Safety of Acrylamide. A Review. *J Agric Food Chem* 2003; 51(16):4504-26.
30. Paulsson B, Larsen K, Törnqvist M. Hemoglobin adducts in the assessment of potential occupational exposure to acrylamides-three case studies. *Scand J Work Env Hea* 2006; 32(2):154–9.
31. Pennisi M, Malaguarnera G, Puglisi V, Vinciguerra L, Vacante M y Malaguarnera M. Neurotoxicity of Acrylamide in Exposed Workers. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2013; 10:3843-54.
32. Spencer P y Schaumburg H. Nervous System Degeneration Produced by Acrylamide Monomer. *Environ Health Persp* 1975; 11:129-33.
33. Kopp EV. Biotransformation and Toxicokinetics of Acrylamide in Humans. [Tesis doctoral] [Aleman]. Würzburg: Universidad Würzburg; 2009.
34. LoPachin RM, Barber DS, Geohagen BC, Gavin T, He D, Das S. Structure-Toxicity Analysis of Type-2 Alkenes: In Vitro Neurotoxicity. *Toxicol Sci* 2007; 95(1):136-46.
35. Philippa E. Neurotoxicity of acrylamide and its analogues and effects of these analogues and other agents on acrylamide neuropathy. *Br J Indus Med* 1975; 32:31-8.

36. Barber D, Stevens S, LoPachin R. Proteomic Analysis of Rat Striatal Synaptosomes during Acrylamide Intoxication at a Low Dose Rate. *Toxicol Sci* 2007; 100(1):156-67.
37. Seale S, Feng Q, Agarwal A, El-Alfy A. Neurobehavioral and transcriptional effects of acrylamide in juvenile rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2012; 101:77-84.
38. Xun-Chang F, Chao S, Hong-Wen G. Transmembrane transports of acrylamide and bisphenol A and effects on development of zebrafish (*Danio rerio*). *J Hazard Mater* 2010; 184:81-8.
39. Parng C, Roy NM, Ton C, Lin Y, McGrath P. Neurotoxicity assessment using zebrafish. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2007; 55:103-12.
40. Dybing E y Sanner T. FORUM Risk Assessment of Acrylamide in Foods. *Toxicol Sci* 2003; 75:7-15.
41. Burgos J y Alfaro J. El Pez Cebra, Un Modelo Incipiente para la Evaluación de Ingredientes. Monográfico de Ingredientes y Materias Primas. *Técnicos 2* 2008; 82-84.
42. Goldsmith JR y Jobin C. Think Small: Zebrafish as a Model System of Human Pathology. *J Biomed Biotechnol* 2012; 1:1-12.
43. Solnica-Krezel L y Driever W. The role of the homeodomain protein *Bozozok* in Zebrafish axis formation. *Int J Dev Biol* 2001; 45:299-310.
44. Rojas-Muñoz A, Miana A, Izpisúa J. El pez cebrá, versatilidad al servicio de la biomedicina. *Investigación y Ciencia* 2007; 62-9.
45. Santoriello C y Zon LI. Hooked! Modeling human disease in zebrafish. *J Clin Invest* 2012; 122(7):2337-43. doi:10.1172/JCI60434.
46. Maldonado E. Experimentación en el pez-cebra, un modelo de biología del desarrollo. *Mensaje Bioquímico* 2003; XXVII:147-56.
47. Lozada J, Palmeros BS, Ramírez MB, Fernández M. El pez cebrá: una especie modelo. *Revista de divulgación científica y tecnológica de la Universidad Veracruzana* [Artículo en línea] 2012. [Consultado 20 Oct 2012]. Disponible en: <http://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol25num1/articulos/pez>
48. Chiu L, Cunningham L, Raible D, Rubel E, Ou H. Using the Zebrafish Lateral Line to Screen for Ototoxicity. *JARO* 2008; 9:178-90.
49. McKenzie Shirlyn B. *Hematología Clínica*. 2ª ed. México: Manual Moderno; 2000.
50. Menke AL, Spitsbergen JM, Wolterbeek AP, Woutersen RA. Normal Anatomy and Histology of the Adult Zebrafish. *Toxicologic Pathology* 2011; 39:759-75.

51. Ferri-Lagneau KF, Moshal KS, Grimes M, Zahora B, Lv L, Sang S y col. Ginger Stimulates Hematopoiesis via Bmp Pathway in Zebrafish. PLoS ONE 2012; 7(6):1-14.
52. Peñuela O. Hemoglobina: una molécula modelo para el investigador. Colomb Med 2005; 36(3):215-25.
53. Kelada SN, Shelton E, Kaufmann RB, Khoury MJ. δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase Genotype and Lead Toxicity: A HuGE Review. Am J Epidemiol 2001; 154:1-13.
54. Ajioka RS, Phillips JD, Kushner JP. Review Biosynthesis of heme in mammals. Biochim Biophys Acta 2006; 1763:723-36.
55. Medina E, Carbajal B, Ponce C, Sandoval N y Valladares E. Las Porfirias. Rev Med Hond 2000; 68:16-24.
56. Hanaoka R, Katayama S, Dawid IB y Kawahara A. Characterization of the heme synthesis enzyme coproporphyrinogen oxidase (CPO) in zebrafish erythrocytes. Genes to Cells 2006; 11:293-303.
57. Rombough P y Drader H. Hemoglobin enhances oxygen uptake in larval Zebrafish (*Danio rerio*) but only under conditions of extreme hypoxia. J Exper Biol 2009; 212:778-84.
58. Roesner A, Hankeln T, Burmester T. Hypoxia induces a complex response of globin expression in zebrafish (*Danio rerio*). J Exper Biol 2006; 209:2129-37.
59. Greene N. y Copp AJ. Review Development of the vertebrate central nervous system: formation of the neural tube. Prenat Diagn 2009; 29:303-11.
60. Fernández D. Sistema Sensorial de Pez Cebra [Artículo en línea] 2006. [Consultado 13 Feb 2013]. Disponible en: <http://pezcebradesarrollo.wordpress.com/sistemas-sensoriales-de-los-peces/>
61. Vargas R, Jóhannesdóttir IT, Sigurgeirsson B, Thorsteinsson H, Karlsson KA. The zebrafish brain in research and teaching: a simple in vivo and in vitro model for the study of spontaneous neural activity. Adv Physiol Educ 2011; 35(2):188-96.
62. Parker MO, Brock AJ, Walton RT, Brennan CH. The role of zebrafish (*Danio rerio*) in dissecting the genetics and neural circuits of executive function. Front Neural Circuits 2013; 7:1-13.
63. Kist LW, Rosemberg DB, Pereira TC, de Azevedo MB, Richetti SK, de Castro Leão J y col. Microcystin-LR acute exposure increases AChE activity via transcriptional ache activation in zebrafish (*Danio rerio*) brain. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 2012; 155(2):247-52. doi: 10.1016/j.cbpc.

64. Sánchez G, Salceda R. Enzimas Polifuncionales: El Caso de la Acetilcolinesterasa. REB 2008; 27(2):44-51.
65. Bertrand C, Chatonnet A, Takke C, Yan Y, Postlethwait J, Toutant JP y col. Zebrafish Acetylcholinesterase Is Encoded by a Single Gene Localized on Linkage Group 7. J Biol Chem 2001; 276(1):464-74.
66. Krishnan K, Mitra NK, Yee LS, Yang HM. A comparison of neurotoxicity in cerebellum produced by dermal application of chlorpyrifos in young and adult mice. J Neural Transm 2012; 119(3):345-52.
67. Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. Dev Dyn 1995; 203(3):253-310.
68. Osorio J, Martínez PN. Análisis del procedimiento para la determinación de la dl50. Revista de investigaciones de la Universidad del Quindío; 4(12):1-3. [Libro electrónico] [Consultado 10 Oct 2012]. Disponible en:
<http://www.ilustrados.com/tema/3965/Analisis-procedimiento-para-determinacion-dl50-dosis.html>
69. Díaz Báez MC, Bulus Rossine GD, Pica Granados Y. Capítulo 5: Métodos Estadísticos para el Análisis de Resultados de Toxicidad [Libro electrónico] 2005. [Consultado 6 Sep 2012] Disponible en:
http://web.idrc.ca/es/ev-84468-201-1-do_topic.html
70. Pedroso GL, Hammes TO, Escobar TD, Fracasso LB, Forgiarini LF, Da Silveira TR. Blood collection for biochemical analysis in adult zebrafish. J Vis Exp 2012; (63) e3865, doi: 10.3791/3865.
71. Murtha J, Qi W, Keller E. Hematologic and Serum Biochemical Values for Zebrafish (*Danio rerio*). Comp Med 2003; 53(1):37-41.
72. García del Moral R. Laboratorio de anatomía patológica. 1ra ed. Madrid: Interamericana-McGraw-Hil; 1993.
73. Jordán J. Apoptosis: muerte celular programada. Bioquímica. 2003; 22(6):100-6.
74. Permady HH. Determinación de la Actividad Antioxidante, Antimutagénica y Anticarcinogénica de Heterantina y Ditaxina Presente en Azafrán de Bolita (*Ditaxis heterantha* Zucc). [Tesis Doctoral]. México DF; 2008.
75. Jacobberger J, Horan P, Hare J. Flow Cytometric Analysis of Blood Cells Stained With the Cyanine Dye DiOC1[3]: Reticulocyte Quantification. Cytometry 1984; 5: 589-600.
76. Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA. HARPER Bioquímica Ilustrada. 28a ed. México, DF: McGraw Hill; 2010.

77. Chan F, Robinson J, Brownlie A, Shivdasani R, Donovan A, Bugnara C. Characterization of Adult α and β globin genes in the zebrafish. *Blood J* 1997; 89(2):688-700.
78. Berlin A. y Schaller, HM. European standardized method for the determination of delta-aminolevulinic acid dehydratase activity in blood. *Z Klin Chem Klin Biochem* 1974; 12(8):389-90.
79. Fleisher J. y Pope E. Colorimetric Method for determination of red blood cell cholinesterase activity in whole blood. *Ind Hygiene Occupational Med* 1969; 9:323-34.
80. Truhaut R. y Vernin H. Microméthode de determinattion de L' activité cholinestérasique dans le sang total. *C Gahiers De Notes Documentaires* 1964; 36:209-14.
81. Randall B. *Biological Monitoring Methods for Industrial Chemicals*. U.S.A: Biomedical Publications; 1980.
82. Abramoff MD, Magalhaes PJ, Ram SJ. Image Processing with ImageJ. *Biophotonics Int* 2004; 1-7.
83. Prophet E, Mills B, Arrington J, Sobin L. *Manual de Técnicas Histológicas. Métodos Histotecnológicos del AFID. Registro de Patología de los EEUU (ARP)*. Washington, D.C; 1992.
84. Panizo A. y Vega F. Técnicas de inmunohistoquímica. Estudio de la apoptosis mediante la técnica de TUNEL. *Rev Esp Patol* 1997; 30(3):243-5.
85. Motamedshariaty VS, Farzad SA, Nassiri-Asl M. y Hosseinzadeh H. Effects of rutin on acrylamide-induced neurotoxicity. *J Pharm Sci* 2014; 22-7.
86. A new polemic to acrylamide toxicity. *Nutrition* 2012; 28(4):426-7.
87. Chang Y, Qi X, Li Z, Wang F, Wang S, Zhang Z y col. Hepatorenal syndrome: insights into the mechanisms of intra-abdominal hypertension. *Int J Clin Exp Pathol* 2013; 6(11):2523-28.
88. Alarcón OM, Ramírez-Fernández M. y Carnevalí-Tatá E. Los mapas enzimáticos tisulares y séricos y la utilidad diagnóstica de los cocientes enzimáticos. *Una revisión. MedULA, Universidad de Los Andes* 1998; 7:1-4.
89. Larginho M, Costa PM, Sousa G, Costa MH, Diniz MS y Baptista PV. Histopathological findings on *Carassius auratus* hepatopáncreas upon exposure to acrylamide: correlation with genotoxicity and metabolic alterations. *J Appl Toxicol* 2013; doi: 10.1002/jat.2936.

90. LoPachin EM y Gavin T. Molecular Mechanism of acrylamide neurotoxicity: lessons learned from organic chemistry. *Environ Health Persp* 2012; 120(12):1650-7.
91. LoPachin RM y Barber DS. Synaptic cysteine sulfhydryl groups as targets of electrophilic neurotoxicants. *Toxicol Sci* 2006; 94(2):240-55.
92. Carere A. Genotoxicity and carcinogenicity of acrylamide: a critical review. *Ann Ist Super Sanita*. 2006; 42(2):144-55.
93. Santoriello C y Zon LI. Hooked! Modeling human disease in zebrafish. *J Clin Invest* 2012; 122(7):2337-43. doi:10.1172/JCI60434.
94. Husain R, Dixit R, Das M y Seht PK. Neurotoxicity of acrylamide in developing rat brain: changes in the levels of brain biogenic amines and activities of monoamine oxidase and acetylcholine esterase. *Ind Health* 1987; 25:19-28.
95. Stobb M, Peterson JM, Mazzag B, Gahtan E. Graph Theoretical Model of a Sensorimotor Connectome in Zebrafish. *PLoS ONE* 2012; 7(5): e37292. doi:10.1371/journal.pone.0037292.
96. Pérez J, Olivera M, Ruiz M, Villar D y Giraldo C. Uso de la actividad colinesterasa para el diagnóstico de intoxicaciones por insecticidas organofosforados y carbamatos. *Rev. MVZ Córdoba* 2012; 17(2):3053-58.