

**Trabajo Original**

**Toxicología Experimental**

## **Rojo Congo y el tránsito gastrointestinal en larvas del pez cebra.**

---

**Álvarez M1., Perdomo L., Navarro E., Arias M.**

Sección de Microscopia, Instituto Anatómico José Izquierdo Facultad de Medicina Universidad Central de Venezuela. Caracas-Venezuela. 01053

[1Marco.alvarez@ucv.ve/](mailto:1Marco.alvarez@ucv.ve/)

[alvarezmentaor@gmail.com](mailto:alvarezmentaor@gmail.com)

---

## Resumen

En el presente trabajo se describe el uso del Rojo Congo para visualizar el tránsito gastrointestinal, resultado fisiológico de las contracciones peristálticas en larvas de pez cebra *Danio rerio*. El método consistió en sumergir a una población larvaria de 5 dpf en distintas concentraciones; 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 y 0,5 mg/ml, del colorante y realizar observaciones directas, no invasiva, a las 0, 6, 16, 22, 28 y 30 h. El Rojo Congo solamente resultó letal a concentraciones por encima de 0,3 mg/ml; siendo está considerada como la Máxima Concentración no Letal. Se estimó un tiempo de llenado del bulbo intestinal entre 6 y 16 h y un tiempo de vaciado y expulsión del contenido intestinal entre 22 y 28 h. Los resultados permitieron demostrar que el Rojo Congo, un colorante que enlaza péptido y emite fluorescencia naranja intensa cuando es estimulado a través de filtros para fluoresceína, describe una cinética fácil de seguir a través de todo el tracto gastrointestinal, lo que podría ser utilizado para evaluar la fisiología de la motilidad intestinal durante diferentes condiciones experimentales; como por ejemplo, bajo manipulación genética, tratamiento con fármacos o exposición a factores ambientales, contribuyendo a facilitar el análisis rápido de la función del órgano digestivo en larvas vivas de pez cebra.

**Palabras Claves:** Rojo Congo, larvas pez cebra, tracto gastrointestinal.

---

## **Abstract**

### ***Congo red and gastrointestinal traffic en zebrafish larvae***

This paper describes the use of Congo red to visualize the gastrointestinal tract flow, a physiological result of peristaltic contractions in larvae of zebrafish *Danio rerio*. The method consisted in submerging a larval population of 5 dpf in different concentrations; 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 and 0.5 mg / ml of the dye and making direct, non-invasive observations at 0, 6, 16, 22, 28 and 30 h. Congo Red was found to be lethal only at concentrations above 0.3 mg / ml, therefore, being considered as the Maximum Non-Lethal Concentration. Time duration of the filling of the intestinal bulb was estimated to be between 6 and 16 h and the duration of the emptying and expulsion of the intestinal content between 22 and 28 h. The results showed that Congo Red, a peptide-binding dye that emits intense orange fluorescence light when stimulated through fluorescein filters, describes easy-to-follow kinetics throughout the gastrointestinal tract, which could be used to evaluate The physiology of intestinal motility during different experimental conditions; Such as under genetic manipulation, drug treatment or exposure to environmental factors, contributing to facilitate rapid analysis of the function of the digestive organ in live larvae of zebrafish.

**Key Words:** Congo red, zebrafish larvae, gastrointestinal tract.

## Introducción

Estudiar *in vivo* el tracto gastrointestinal (TG) y su fisiología es esencial para entender los procesos del desarrollo así como para conocer la etiología de distintas patologías intestinales. En el pez cebra, se han descrito varias técnicas y procedimientos para ello, incluyendo el uso de emulsiones de microgavas de dextrans y microesferas marcadas fluorescentemente [1,2]. Estos procedimientos han permitido obtener información sobre algunos órganos implicados en el metabolismo de los ácidos grasos, incluyendo el hígado y el páncreas, además de evaluar la regulación temporal y espacial de la incorporación y expulsión de sustancia a través del intestino. Sin embargo, un inconveniente en el uso de estos procedimientos ha sido lo laborioso de la vía de administración, lo cual ha motivado la búsqueda de otras alternativas de más fácil suministro sin la complicación que presenta la preparación e incorporación de las emulsiones. Particularmente con el pez cebra, la aplicación de pequeños compuestos fluorescentes ha demostrado ser una herramienta útil para la obtención de imágenes de tejidos y estructuras subcelulares [3]. En los últimos años, los colorantes vitales y las sondas fluorescentes han recibido considerable atención debido a su potencial para la quimio-sensibilidad y las bio-imágenes; de hecho, se ha desarrollado una biblioteca de compuestos fluorescentes para la detección y etiquetado específico de las estructuras larvarias en el pez cebra [4,5]. Este modelo animal ha permitido evaluar pequeñas sustancias químicas que simplemente añadidas en el agua en donde se mantiene, desarrollan y crecen las larvas, son absorbidas por estas [6]. En el presente estudio hemos hecho uso del Rojo Congo (RC) [7], una pequeña molécula colorante diazoica con tamaño de 21 Armstrong, capaz de teñir sustancia del tipo peptídico al interior del intestino, que pueden corresponder a fragmentos de proteínas presentes en el tracto intestinal como parte del proceso digestivo. Este contenido podría ser visualizado y seguido a través de la fluorescencia emitida por el colorante. Cuando éste es observado mediante el microscopio de fluorescencia, utilizando un sistema de filtros para fluoresceína, emite una intensa fluorescencia que va desde un tono anaranjado a uno color rojo intenso y que se ve poco afectada aunque la cantidad de péptidos sea escaso. La incorporación de este colorante, por parte de las larvas, permitiría delinear la estructura del TG, así como visualizar y seguir la trayectoria y el desplazamiento del contenido de sustancias dentro de este importante órgano.

## **Materiales y método**

Letalidad del Rojo Congo (RC).

Distintas concentraciones de RC, comprendidas entre 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 y 0,5 mg/ml y preparadas en agua de pecera filtrada, fueron ensayadas sobre poblaciones larvarias de 5 dpf, colocadas en capsula de 24 pozos a razón de 5 larvas/pozo/concentracion, durante un tiempo de 30 horas de incubación, en oscuridad y temperatura ambiente. Trascurrido dicho tiempo se graficó el % de sobrevivencia y se determinó la Máxima Concentracion no Letal (MCNL) de RC.

Transito Gastrointestinal del RC a la MCNL.

El RC a la MCNL, fue seguido dentro del TG con el uso del microscopio de fluorescencia Olympus IX71, a distintos tiempos de incubación de 6, 16, 22, 28 y 30 h. Durante este periodo de observación se determinó y graficó la intensidad de fluorescencia naranja emitida por el RC. Para ello, se hizo uso del programa Image J. Se realizó una secuencia de imágenes sobre el procedo de expulsión del colorante.

## **Resultados**

Los resultados muestran que el RC solamente resultó letal para la población larvaria a concentraciones mayores de 0,3 mg/ml (Fig.1A). Se estimó 0,3 mg/ml, como la CMNL con la cual se realizaron las observaciones del desplazamiento y vaciado del contenido del TG. El RC, fue visualizado a través de una intensa fluorescencia naranja que fue desplazándose y disminuyendo en función del tiempo (Fig.1B, 1C). Tomado en consideración, de manera esquemática el TG (fig.2A), se pudo describir el movimiento del colorante dentro de TG, partiendo de una máxima concentración en el bulbo intestinal, atravesando intestino medio y posterior, hasta alcanzar el orificio anal (Fig.2B). Se estimó un tiempo máximo de llenado entre 6 y 16 h y un tiempo de expulsión entre las 22 y 28 h.

## **Discusión**

El tracto gastrointestinal (TG) del pez cebrá muestra una anatomía y una arquitectura celular similar al TG humano, con capas concéntricas de epitelio interno, tejido conectivo, músculo circular y capas musculares longitudinales externas. La propulsión del contenido luminal es el resultado de la actividad integrada de las células del músculo liso, las neuronas entéricas y las células intersticiales de Cajal [8]. Una de las ventajas de las larvas de pez cebrá es que son transparentes y las contracciones de propagación en todo el tracto gastrointestinal son fáciles de ser visualizadas [9]. En este trabajo, describimos la aplicación de un compuesto altamente conocido en el campo de la histoquímica como es el RC, el cual nos permitió registrar de una manera sencilla el delineado de la

estructura del TG, así como visualizar y seguir la trayectoria, el desplazamiento y el proceso de expulsión del contenido intestinal de este importante órgano. En comparación con los procedimientos utilizados en los estudios avanzados sobre la fisiología del TG [10], resultó sencillo y de fácil aplicación ya que pudo ser incorporado a través de una simple inmersión de la población larvaria en la solución adecuada. Los resultados obtenidos nos permitieron establecer una cinética de absorción y tránsito del colorante, a través de la visualización de la carga intestinal en el modelo de pez cebra, con un análisis en tiempo real, mediante el seguimiento y registro de la intensidad de la fluorescencia emitida por el contenido en movimiento. Cabe destacar que no se alcanzó a determinar más específicamente algún tipo de actividad enzimática o definir alguna función clave de los órganos digestivos que nos permitiera cuantificar procesos mecánicos de absorción o disponibilidad de nutrientes en un estudio más completo de la fisiología gastrointestinal, visualizando simultáneamente proteínas intestinales y la transformación de lípidos en larvas vivas de pez cebra; tal como es el caso de otros autores [11], quienes haciendo uso de proteínas fluorescente, han descrito variaciones en las actividades de fosfolipasa intestinal y proteasa así como evaluado la función de importantes órganos como el páncreas, esencial para las actividades de la proteasa digestiva. Sin embargo, resultó extremadamente fácil observar directamente el tránsito intestinal en las larvas vivas, por lo que cabría pensar que el RC, podría ser utilizado para evaluar la fisiología de la motilidad intestinal durante diferentes condiciones experimentales; como por ejemplo, bajo manipulación genética, tratamiento con fármacos o exposición a factores ambientales, contribuyendo a facilitar el análisis rápido de la función del órgano digestivo en larvas vivas de pez cebra.

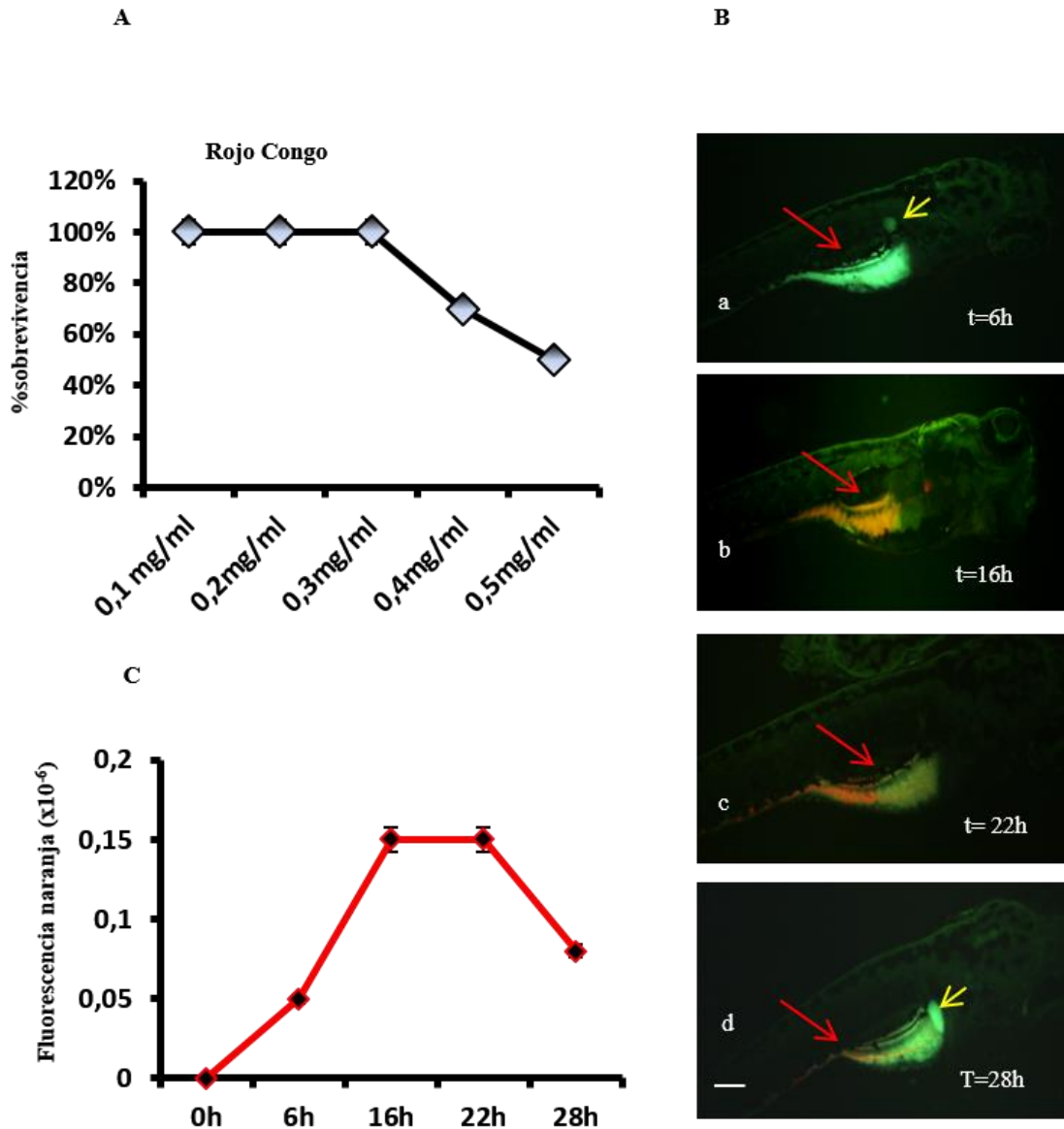


Fig.1. Determinación de la Máxima Concentración no Letal (MCNL), de Rojo Congo (RC). Solamente se observa letalidad a elevadas concentraciones por encima de 0,3mg/ml (Fig.1A). Se destaca la secuencia de llenado y vaciado del bulbo intestinal (flechas) en función de la intensidad de la fluorescencia (Fig.1B) y del tiempo en larvas de pez cebra *Danio rerio* (Fig.1C); la fluorescencia naranja del Rojo Congo, se visualiza entre 6 h y las 16 h, definiendo el tiempo de llenado. Luego un tiempo de vaciado del bulbo intestinal hacia el intestino medio y posterior entre 22 y 28 h. Se observa la vesícula biliar (flecha corta en amarillo). La señal de intensidad de fluorescencia del RC se estima como un valor de  $S = \text{área de ROI} \times \text{variación de la intensidad de la fluorescencia en el área de ROI}$ , estimado con el programa ImageJ. Imágenes realizadas con una cámara Olympus DP71.Obj.4x. Barra=780 $\mu$ m.

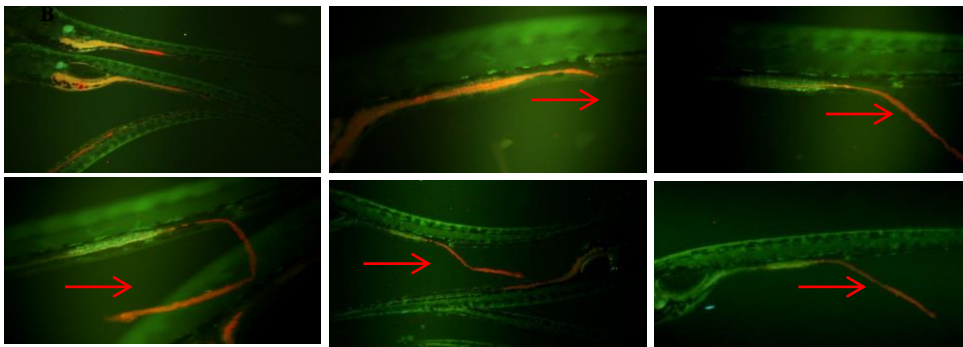
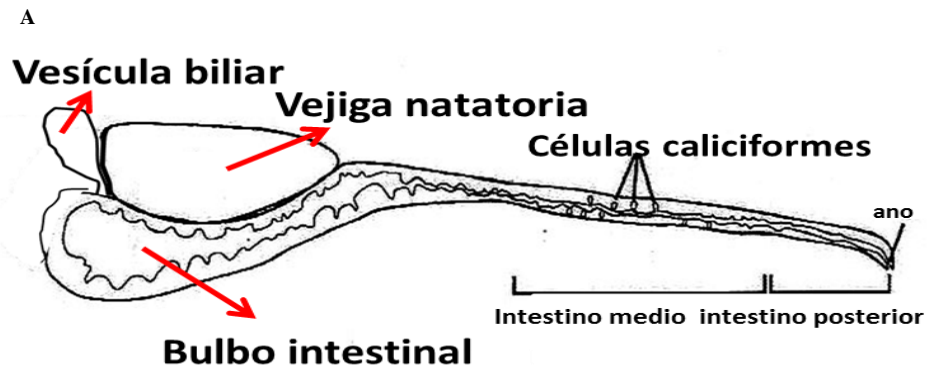


Fig.2. Secuencia de vaciado del RC a través del tracto gastrointestinal (esquema. *Modificado de Annie.N.Y.Ng y col, 2005*). (Fig.2A). Se resalta el proceso de expulsión del colorante en una serie de imágenes (flechas), desde el bulbo intestinal (Fig.2B), hacia el intestino medio y posterior (flechas).



## Referencias

1. Jordan L. Cocchiaro and John F. Rawls. Microgavage of Zebrafish Larvae. [Dis Model Mech](#). 2016. 1; 9(5): 529–540.
2. Kotaro Hama, Elayne Provost, Timothy C. Baranowski, Amy L. Rubinstein, Jennifer L. Anderson, Steven D. Leach, and Steven A. Farber. In vivo imaging of zebrafish digestive organ function using multiple quenched fluorescent reporters. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009. (296): G445–G453.
3. Sander, V.; Patke, S.; Sahu, S.; Teoh, C.L.; Peng, Z.; Chang, Y.-T.; Davidson, A.J. The small molecule probe PT-Yellow labels the renal proximal tubules in zebrafish. *Chem. Commun.* 2014, 51, 395–398.
4. Veronika Sander, Shantanu Patke, Jung Y. Lee, Young-Tae Chang and Alan J. Davidson. The Vital Dye CDr10b Labels the Zebrafish Mid-Intestine and Lumen. *Molecules* 2017; 22: 454-464.
5. Lee, J.S.; Kim, Y.K.; Vendrell, M.; Chang, Y.-T. Diversity-oriented fluorescence library approach for the discovery of sensors and probes. *Mol. BioSyst.* 2009, 5, 411–421.
6. Rich A. A new high-content model system for studies of gastrointestinal transit: the zebrafish. *Neurogastroenterol Motil.* 2009 Mar; 21(3):225-228.
7. <file:///Documents/rojo-congo-definicion-21378-nhpo41.pdf>. 2015
8. Annie N.Y. Nga,<sup>1</sup> Tanya A. de Jong-Curtaina,<sup>1</sup> David J. Mawdsley,<sup>1</sup> Sara J. Whitea, Jimann Shin,<sup>b</sup> Bruce Appelb, P. Duc Si Dongc, Didier Y.R. Stainierc, Joan K. Heatha. Formation of the digestive system in zebrafish: III. Intestinal epithelium morphogenesis. *Dev Biol.* 2005 Oct 1; 286(1):114-35.
9. Westerfield, M. *The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*, 4th ed.; University of Oregon Press: Eugene, OR, USA, 2000.
10. Carten, J.D.; Bradford, M.K.; Farber, S.A. Visualizing digestive organ morphology and function using differential fatty acid metabolism in live zebrafish. *Dev. Biol.* 2011, 360, 276–285.
11. Field, H.A. Kelley A,L, Martell, A. M, Goldstein & Serluca, F. C. Analysis of gastrointestinal physiology using a novel intestinal transit assay in zebrafish. *Neurogastroenterol Motil.* 2009 21, 304–312.

**Recibido: 26/03/17**

**Aceptado: 29/03/17**