

Título de la propuesta:

**ACTIVIDAD METABÓLICA DE FAD EN EMBRIONES DE PECES CEBRA (*DANIO RERIO*)
SOMETIDOS A HIPOXIA, EMPLEANDO MICROSCOPIA FLIM**

Responsable: BIANCHI Mariana, mariana.bianchi@uner.edu.ar

Integrantes del Equipo: ORMAECHEA, M. Valeria, PARAVANI, Enrique; PORCARO, Andrea; RODA, Rocío.

Unidad Académica: Facultad de Ingeniería

Situación Problemática:

La coenzima FAD (oxidada) es una molécula autofluorescente y tiene propiedades únicas debido a que sus funciones de desintegración de la fluorescencia llevan información directa sobre el estado metabólico de las células. La vida media de la fluorescencia (T_m) del FAD depende de su estado, unido a proteínas tiene un T_m de unos 100 ps y libre de unos pocos ns [1]. Las proporciones de FAD libre y unido a proteínas dependen del tipo de metabolismo celular. La microscopia de tiempo de vida de la fluorescencia (FLIM) es un excelente método para medir el tiempo de vida de un fluoróforo con resolución espacial microscópica, siendo una herramienta útil para detectar y visualizar el funcionamiento de los sistemas biológicos [2]. El tiempo de vida de un fluoróforo describe que tan rápido decae desde un estado excitado. Esta técnica, al resolver imágenes del tiempo de vida de un fluoróforo, proporciona otra dimensión de información, además de su visualización [3]. Además, no es necesario utilizar tinciones químicas [4].

Utilizando técnicas de microscopía FLIM *in toto* en embriones de pez cebra se realizó un ensayo que permitió detectar cambios sutiles y tempranos en el metabolismo celular, al ser expuesto a diferentes sustancias.

Objetivos:

Obtener información del estado metabólico de los embriones del pez cebra (*Danio rerio*) *in toto*, en condiciones normales y expuestos a una solución 1mM de KCN, empleando microscopia FLIM.

Resultados alcanzados:

Se utilizaron embriones de peces cebra de 24 horas post-fertilización, ya que la ausencia de pigmentación permite buenas observaciones microscópicas. Los embriones fueron decorionados y un grupo se expuso, durante cuatro minutos, a una solución 1mM de KCN, un inhibidor de la respiración celular. Posteriormente el grupo control (sin 1mM KCN) y el grupo expuesto fueron fijados en formalina. Para obtener la imagen de FLIM se utilizó un microscopio invertido de fluorescencia laser confocal, el tejido fue excitado con un láser de 405 nm con pulsos de 65 ps y 80 MHz y el haz atravesó un cubo de filtros pasabanda de 500-550 nm para capturar la señal del FAD.

Contactos:



inexa@uner.edu.ar



3442421518

Las imágenes se obtuvieron con una lente de 40X y un tiempo de exposición de un minuto. Se seleccionaron dos regiones de interés para el análisis, el ojo y la cola. Se realizó un análisis bi-exponencial. Se obtuvieron los parámetros T_m , t_1 (tiempo de vida media de la fluorescencia del componente corto, corresponde a FAD ligado a proteínas), t_2 (tiempo de vida media de la fluorescencia del componente largo, corresponde a FAD libre), α_1 (fracción del t_1) y α_2 (fracción del t_2).

En el ojo de los embriones no se observaron diferencias en ninguno de los parámetros estudiados. Estos resultados se corresponden al tipo de metabolismo presente, glucólisis aerobia [5]. En la cola en cambio, el tratamiento provocó una disminución significativa de la relación α_2/α_1 , indicando una disminución en la proporción FAD libre/FAD unido a proteínas. La inhibición de la cadena respiratoria por medio de KCN, provocaría la inhibición del complejo II, y en consecuencia la inhibición de la oxidación de succinato a fumarato, reteniendo a la coenzima FAD unida a la enzima succinato deshidrogenasa [6]. En conclusión, estos resultados indican una reducción del metabolismo celular provocado por el KCN.

- [1] W. Becker et al., "Metabolic imaging by simultaneous 2-photon FLIM of NAD(P)H and FAD," in *Multiphoton Microscopy in the Biomedical Sciences* XX, Feb. 2020, vol. 11244, p. 112440L, doi: 10.1117/12.2550962.
- [2] L.-C. Chen, W. R. Lloyd, C.-W. Chang, D. Sud, and M.-A. Mycek, "Chapter 20 - Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy for Quantitative Biological Imaging," in *Methods in Cell Biology*, vol. 114, G. Sluder and D. E. Wolf, Eds. Academic Press, 2013, pp. 457–488.
- [3] C.-W. Chang and M.-A. Mycek, "Total variation versus wavelet-based methods for image denoising in fluorescence lifetime imaging microscopy," *J. Biophotonics*, vol. 5, no. 5–6, pp. 449–457, 2012, doi: 10.1002/jbio.201100137.
- [4] W. R. Zipfel et al., "Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 100, no. 12, pp. 7075–7080, Jun. 2003, doi: 10.1073/pnas.0832308100.
- [5] MA. Kanow et al., "Biochemical adaptations of the retina and retinal pigment epithelium support a metabolic ecosystem in the vertebrate eye". *Elife*. 2017 Sep 13; 6:e28899. doi: 10.7554/eLife.28899.
- [6] S. Chakraborty et al. "Quantification of the Metabolic State in Cell-Model of Parkinson's Disease by Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy". *Sci Rep* 6, 19145 (2016). <https://doi.org/10.1038/srep19145>

Contactos:



inexa@uner.edu.ar



3442421518