



**Universidad de Concepción
Facultad Farmacia**

**IMPLEMENTACIÓN DE UN MODELO EN PEZ CEBRA
(*DANIO RERIO*) DE ATEROGÉNESIS TEMPRANA
INDUCIDO POR DIETA ALTA EN GRASA**

POR ABSALON ABRAHAM ACUÑA FUENTES

Tesis presentada a la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción
para optar al título profesional de Bioquímico

Profesor patrocinante

Dr. Claudio Aguayo Tapia
Departamento de Bioquímica Clínica
Facultad de Farmacia
Universidad de Concepción

Profesora guía

Dra. Javiera De la Paz Montt
Departamento de Biología Celular
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Mayo de 2024
Concepción, Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

© 2024, Absalon Abraham Acuña Fuentes

INDICE

RESUMEN	VII
ABSTRACT.....	IX
INTRODUCCIÓN	11
1. La aterosclerosis	14
2. Fisiopatología de la aterosclerosis	15
3. Etapas de la aterosclerosis:	15
3.1. Inicio de la lesión:	15
3.2. Formación de células espumosas:.....	18
3.3. Migración y proliferación de células de músculo liso:	21
3.4. Inducción de la adhesión y agregación plaquetaria.	23
4. Modelos experimentales para el estudio de la aterogénesis	25
4.1. Modelo ratón	27
4.2. Modelo rata	28
4.3. Modelo paloma	28
4.4. Modelo conejo.....	29
4.5. Modelo <i>Danio rerio</i>	31
PROBLEMA.....	37
PREGUNTA	37
HIPÓTESIS	38
OBJETIVOS:.....	39
1. Objetivo general	39
2. Objetivos específicos.....	39
MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
1. Aprobación ética.....	40
2. Modelos animales:.....	40
3. Bioseguridad.....	41
4. Mantenimiento de peces cebra.....	41

5. Preparación de las dieta.....	42
6. Grupos experimentales:	43
7. Mortalidad y Determinación de Parámetros de Crecimiento:	44
8. Medición de parámetros bioquímicos	44
9. Conteo de granulocitos.....	45
10. Gránulos de lípidos en hígado del pez cebra	46
11. Análisis estadístico.	47
RESULTADOS.....	48
1. Mortalidad:.....	48
2. Crecimiento de larvas de pez cebra.	48
3. Descripción del Perfil Bioquímico	50
4. Identificación de acumulación de lípidos y granulocitos en el sistema vascular.....	53
5. Análisis cualitativo de lípido total en el sistema vascular.....	55
6. Conteo de granulocitos.....	56
7. Densidad de gránulos de lípidos en hígado	57
DISCUSIÓN	61
CONCLUSIÓN	70
BIBLIOGRAFÍA	73
ANEXO 1.....	87
ANEXO 2.....	88

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Ventajas y limitaciones de los modelos de ratón y pez cebra para la investigación de la aterosclerosis y la dislipidemia.	35
Tabla 2: Perfil hepático de larvas pez cebra alimentado con dieta alta en grasa.....	51
Tabla 3: Perfil lipídico en larvas pez cebra alimentadas con dieta alta en grasa.....	52

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Papel de OxLDL en la disfunción endotelial	18
Figura 2: Papel de OxLDL en la formación de células espumosas	20
Figura 3: Papel de OxLDL en la proliferación y migración de células de músculo liso	22
Figura 4: Papel de OxLDL en la función pro-aterosclerótica de las plaquetas	24
Figura 5: Mortalidad porcentual acumulada para larvas pez cebra alimentadas con dieta alta en grasa.	49
Figura 6: Medidas morfológicas de larvas pez cebra alimentadas con dieta alta en grasa.	50
Figura 7: Sistema vascular de larvas de pez cebra	54
Figura 8: Depósito de lípido en el sistema vascular en larvas pez cebra alimentadas con dieta alta en grasa.	55
Figura 9: Acumulación de lípido en el sistema vascular de larvas pez cebra alimentadas con dieta alta en grasa.	56
Figura 10: Cuantificación de granulocitos en la región de la vena cardinal en larvas pez cebra alimentadas con dieta alta en grasa.	57
Figura 11: Densidad de gránulos de lípidos en hígado diseccionado desde larvas pez cebra alimentadas con dieta alta en grasa.	59
Figura 12: Tamaño de gotas de lípido en hígado diseccionado desde larvas pez cebra alimentadas con dieta alta en grasa.....	59

RESUMEN

La enfermedad cardiovascular aterosclerótica es la principal causa de muerte a nivel nacional y global, es un proceso inflamatorio crónico marcado por la interacción de lipoproteínas, células inmunitarias y componentes celulares de la pared de los vasos sanguíneos. Un factor clave en el desarrollo de esta enfermedad es el aumento de lipoproteínas de baja densidad oxidadas (oxLDL), que promueven la disfunción endotelial y la formación de células espumosas, contribuyendo a la formación de estrías grasas, las cuales son el sello distintivo de aterosclerosis temprana. A pesar de que la aterosclerosis se desarrolla lenta y silenciosamente, hasta el día de hoy hay una ausencia de modelos experimentales adecuados para estudiar la enfermedad cardiovascular considerando su largo progreso, lo que dificulta estudiar los tratamientos para la aterosclerosis temprana y no permiten tener una idea clara de su complejidad *in vivo*, a lo largo de la vida de un individuo y en entorno fisiológico real. Por lo tanto, es necesario desarrollar en un modelo animal de aterosclerosis que permita comprender la patogénesis de la enfermedad desde sus inicios. En este contexto se evaluó el efecto de una dieta aterogénica a 4% (p/p) de colesterol sobre larvas pez cebra (*Danio reio*). En este modelo determinó el efecto el perfil bioquímico, la acumulación de lípidos en el sistema vascular y la respuesta inflamatoria localizada. Nuestros resultados muestran diferencias entre los peces alimentados con la dieta alta en colesterol y los controles, así se observó acumulación de lípido en la vasculatura, y una mayor cantidad de granulocitos localizados en la región perivascular, mayores concentraciones de las proteínas

AST, TP, LDH, CRP. Además, se observa un aumento en los parámetros morfométricos y un mayor tamaño de gotas de lípido a nivel hepático. Estos resultados muestran que efectivamente el pez cebra desarrolla lesiones aterogénicas, inflamación y acumulación de células inflamatorias y permiten proponerlo como modelo para estudiar las etapas tempranas de la aterogénesis puede ser altamente valioso.

ABSTRACT

Atherosclerotic cardiovascular disease is the leading cause of mortality both nationally and globally. It represents a chronic inflammatory process characterized by the interaction of lipoproteins, immune cells, and cellular components of the vascular wall. A pivotal factor in developing this disease is the increase of oxidized low-density lipoproteins (ox-LDL), which promote endothelial dysfunction and the formation of foam cells, contributing to the development of fatty streaks, a hallmark of early-stage atherosclerosis. Despite the slow and silent progression of atherosclerosis, to date, there remains a lack of adequate experimental models to study cardiovascular disease given its prolonged progression, complicating the exploration of treatments for early atherosclerosis and obscuring a clear understanding of its complexity in vivo over an individual's lifetime and within an physiological context. Therefore, it is essential to develop an animal model of atherosclerosis that allows for an understanding of the disease's pathogenesis from its onset. In this context, we present a study involving the administration of a 4% (w/w) cholesterol atherogenic diet in zebrafish larvae (*Danio rerio*) due to several advantages compared to other models. We evaluated differences in the biochemical profile, lipid accumulation in the vascular system, and localized inflammatory response. Among the differences observed between fish fed the high-cholesterol diet and controls were increased lipid accumulation in the vasculature and a higher quantity of granulocytes localized in the perivascular region, elevated levels in the biochemical profile (AST, TP, LDH, CRP), increased

morphometric parameters, and larger hepatic lipid droplets. These results demonstrate that zebrafish effectively develop indicators of atherogenic lesions and that their use as a model to study the early stages of atherogenesis can be highly valuable.

INTRODUCCIÓN

Las Enfermedades Cardiovasculares (ECV) son un grupo heterogéneo de enfermedades que afectan al sistema circulatorio, entre las cuales podemos mencionar a: arteriosclerosis, angina de pecho, hipertensión arterial, hipercolesterolemia, infarto agudo de miocardio (IAM), insuficiencias cardíacas, enfermedad cerebrovascular, trombosis arterial periférica. Las ECV siguen siendo la principal causa de muerte en Chile y en el mundo. La carga de enfermedad cardiovascular representó el año 2015 el 12,97% del total de los años de vida ajustados por discapacidad (AVISA), ocupando el segundo lugar después de las neoplasias y causando un 27.5% del total de defunciones (CIE-10 I00-I99) (28.318 defunciones, tasa 157.27/100.000), a expensas principalmente del ataque cerebrovascular (ACV) con un 30 % y del IAM con un 29% (MINSAL 2015).

La arteriosclerosis es el término general que se utiliza para abarcar diversas enfermedades caracterizadas por el remodelado y engrosamiento de los vasos sanguíneos que pierden así su elasticidad. Este fenómeno ocurre especialmente en arterias de mediano y gran calibre, en donde se produce disfunción del endotelio debido a una lesión inicial que altera su permeabilidad y que permite la difusión pasiva al espacio subendotelial de material lipídico, tejido fibroso, depósitos de calcio y otros elementos sanguíneos (Fuster *et al.*, 1992). Esto provoca la formación de la placa de ateroma, engrosamiento de la capa íntima de las arterias y una disminución del diámetro de lumen arterial. Las lesiones ateroscleróticas progresan de forma asintomática durante décadas

haciendo que estos vasos se vuelvan menos flexibles y reduciendo aún más el lumen arterial con lo que disminuye el flujo sanguíneo pudiendo ocasionar episodios isquémicos locales o distales de la zona de estrechamiento, ya sea en el corazón (arterias coronarias), en el cerebro (carótidas cerebrales y vertebrales) o en las extremidades inferiores (aorta, íleaca y femorales). Los episodios donde se reduce la luz del vaso drásticamente por erosión de la placa o rotura, y la formación de un trombo por efecto de la exposición a ciertos factores pro coagulantes al torrente sanguíneo, tienen repercusiones clínicas tan importantes como el infarto del miocardio y cerebral, o la claudicación de las extremidades inferiores (Fuster *et al.*, 1992). Aunque se conoce que la aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria caracterizada por la alteración del metabolismo de los lípidos y la respuesta inflamatoria (Badimon *et al.*, 2009). La inflamación que afecta principalmente a las grandes arterias elásticas, se inicia por un insulto al endotelio que conduce a la activación de sus células endoteliales y al reclutamiento de células inflamatorias en la pared del vaso (Viola *et al.*, 2015). Varios factores pro-apoptóticos están presentes en las placas ateroscleróticas, por ejemplo, las lipoproteínas de baja densidad oxidadas (oxLDL). Estas oxLDL, participan en la formación y progresión de las lesiones desencadenando la acumulación de lípidos e inflamación local que daña la pared vascular (Mak A & Kow, 2014; Moccia *et al.*, 2014). La acumulación de oxLDL es un factor clave en la aterogénesis y se considera un indicador temprano de disfunción endotelial que posteriormente conduce a trastornos de la pared vascular.

La oxLDL desempeña un papel crítico en la formación de placa aterosclerótica mediante al menos dos mecanismos que han sido previamente investigados por

varios autores: i) la oxLDL induce activación de células endoteliales, favorece la disfunción y favorece su disfunción o apoptosis; y ii) oxLDL media la migración de monocitos a la pared del vaso y su diferenciación en células espumosas. Puntualmente, Buckley *et al.*, (1996) demostraron que la oxLDL disminuye la relajación dependiente del endotelio en los vasos sanguíneos. Además, se ha demostrado que el oxLDL incrementa la producción de iones de superóxido y disminuye la biodisponibilidad del óxido nítrico (NO) (Searle *et al.*, 2010). Chein *et al.*, (2007) demostró que la vaso-relajación dependiente del endotelio está disminuida en arterias coronarias de cerdo tratadas con oxLDL por una vía dependiente de la inhibición en la biodisponibilidad de NO (Chen *et al.*, 2007). Estos estudios, junto con otros (Yamamoto *et al.*, 2015; Wong *et al.*, 2011), demostraron que la disfunción de células endoteliales inducida por oxLDL se asocia con cambios en la expresión y actividad de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), la biodisponibilidad de NO y la producción de radicales libres de oxígeno (ROS). Finalmente, se propone que la oxLDL induce muerte celular endotelial a través de la activación de las vías metabólicas, empeorando la disfunción del tejido endotelial y promoviendo la progresión de las placas ateroscleróticas (Chen *et al.*, 2007; Yamamoto *et al* 2015).

Por otro lado, la oxLDL no solo actúa sobre el endotelio, sino también sobre otros tipos celulares que contribuyen al desarrollo de la aterosclerosis. Así, oxLDL aumenta la proliferación y migración de células musculares lisas (SMC), induce la generación de colágeno por parte de los fibroblastos y la migración y diferenciación de monocitos a macrófagos (Chen *et al.*, 2001; Dieudonne *et al.*,

2012; Xu *et al.*, 2012). Y a la vez inhibe la salida de macrófagos desde la placas ateroscleróticas causando su atrapamiento en la íntima, contribuyendo así a la formación de células de espuma, la inflamación de la pared vascular, y finalmente el desarrollo de aterosclerosis (Lee *et al.*, 2014).

1. La aterosclerosis

La aterosclerosis, es un trastorno crónico y progresivo que afecta las arterias de mediano y gran calibre, representa una de las principales preocupaciones en salud pública a nivel mundial según la Organización Mundial de la Salud. Este proceso patológico, caracterizado por el engrosamiento y la pérdida de elasticidad de las paredes arteriales, desencadena una serie de eventos que pueden tener consecuencias devastadoras para la salud cardiovascular (Libby *et al.*, 2011). La acumulación de lípidos, células inflamatorias y otros componentes en la pared arterial conduce a la formación de placas ateroscleróticas, que pueden obstruir parcial o completamente el flujo sanguíneo, provocando una disminución del suministro de oxígeno y nutrientes a los tejidos.

La aterosclerosis se asocia estrechamente con enfermedades cardiovasculares graves, como el infarto de miocardio y el accidente cerebrovascular, que representan una de las principales causas de mortalidad en todo el mundo. Además, esta enfermedad puede afectar a diversas áreas del cuerpo, incluyendo el corazón, el cerebro y las extremidades, lo que amplifica su impacto clínico.

2. Fisiopatología de la aterosclerosis

Durante años, diversas teorías han intentado explicar el origen y las causas de la enfermedad aterosclerótica, desde la hipótesis trombogénica hasta la hipótesis lipídica. Sin embargo, la hipótesis de respuesta crónica al daño, propuesta por Ross y Glomset en 1976, es la más ampliamente aceptada en la actualidad. Esta teoría sugiere que las lesiones ateroscleróticas surgen como consecuencia de una lesión en el endotelio vascular, desencadenada por factores como la hipertensión arterial, el tabaquismo, la diabetes y la dislipidemia.

A medida que las placas ateroscleróticas crecen, pueden ocasionar la obstrucción parcial o total del flujo sanguíneo en las arterias afectadas. Además, las placas pueden volverse inestables y propensas a la ruptura, lo que puede desencadenar la formación de trombos y la obstrucción aguda del vaso, con consecuencias graves como el infarto de miocardio o el accidente cerebrovascular (Ross, 1995).

3. Etapas de la aterosclerosis:

3.1. Inicio de la lesión:

La disfunción endotelial es una condición patológica en la que el endotelio muestra un deterioro de las propiedades antiinflamatorias, anticoagulantes y reguladoras vasculares. En la actualidad se considera un evento crucial en el

desarrollo de la aterosclerosis. La OxLDL formada y retenida en el espacio sub-entotelial activa las células endoteliales (CE) mediante la inducción de moléculas de adhesión a la superficie celular que, a su vez, provocan el rodamiento y la adhesión de los monocitos sanguíneos y las células T. Se informa que OxLDL induce la expresión de la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) y la molécula de adhesión de células vasculares 1 (VCAM-1), aumentando las propiedades adhesivas del endotelio de manera similar a los efectos de los proinflamatorios de citocinas como interleucina 1 beta (Frostedgard *et al.*, 1991).

Los leucocitos sanguíneos reclutados migran hacia la túnica íntima, guiados por quimiocinas. De hecho, OxLDL estimula las CE y las SMC para que secretan proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1) y factor estimulante de colonias de monocitos (mCSF) que inducen el reclutamiento de monocitos en la pared endotelial. Por otro lado, OxLDL puede ser quimiotáctico para monocitos y linfocitos T (ya que posee lisofosfatidilcolina) y también para macrófagos (Quinn *et al.*, 1987).

El óxido nítrico (NO), es reconocido como una molécula esencial para la protección cardiovascular, debido a que posee propiedades vasodilatadoras y evita la adhesión de leucocitos y plaquetas al endotelio. Este se genera en la vasculatura por la NO sintasa endotelial (eNOS); el deterioro de la producción y secreción de NO por parte de las CE se considera una de las características más importantes de la disfunción endotelial (Förstermann *et al.*, 2012). La generación de NO a partir de las CE es inhibida por OxLDL, dado que OxLDL es capaz de inducir el agotamiento del colesterol en las invaginaciones de la membrana plasmática, lo que ocasiona la translocación de la proteína caveolina y eNOS

desde los dominios de membrana, inhibiendo la actividad de eNOS en las CE. Además, se han sugerido otros mecanismos para justificar el efecto inhibitor de OxLDL sobre la producción de NO en las CE. Se ha reportado que OxLDL conduce a un aumento del estrés oxidativo en las CE, generando cantidades significativas de superóxido, que químicamente desactiva el NO, formando peroxinitrito (Cominacini *et al.*, 2001).

El receptor 1 de LDL oxidado similar a la lectina (LOX-1), reconocido como el principal receptor OxLDL en las CE, se encuentra presente en diversas condiciones proinflamatorias y juega un papel esencial en la disfunción endotelial inducida por OxLDL (Chen *et al.*, 2002). De hecho, en lesiones ateroscleróticas humanas, se ha observado una sobreexpresión de LOX-1 en CE, especialmente en la etapa temprana de formación de placa (Katoaka *et al.*, 1999). Se ha notado que la eliminación de LOX-1 inhibe la expresión de MCP-1 en CE humanas estimuladas con OxLDL, mientras que la vía de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) desempeñaría un papel crucial en este proceso (Li *et al.*, 2000). Además, OxLDL puede promover la regulación positiva de las moléculas de adhesión endotelial como ICAM-1 y VCAM-1 de una manera dependiente de LOX-1, lo cual está mediado por el factor nuclear κ B (NF- κ B) (Li *et al.*, 2002). Asimismo, los efectos inhibidores de OxLDL sobre la producción endotelial de NO se han relacionado con la función LOX-1. Por último, se ha sugerido que OxLDL puede inducir la apoptosis de las células endoteliales mediante la activación de las vías NF- κ B y AP-1 (Leiva *et al.*, 2015), lo que agrava la disfunción endotelial y promueve la progresión de la placa aterosclerótica (figura1).

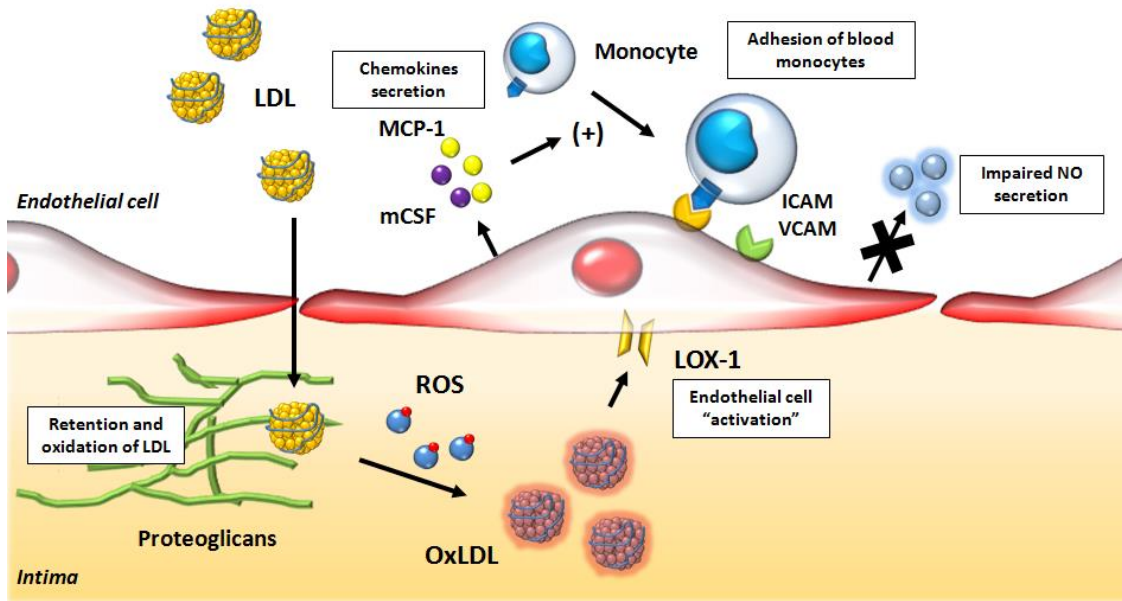


Figura 1: Papel de OxLDL en la disfunción endotelial (Leiva et al., 2015)

3.2. Formación de células espumosas:

Una vez que los monocitos ingresan a la matriz extracelular subendotelial (ECM), se transforman en macrófagos que expresan diversos receptores de captación de lípidos como SR-AI/II, SR-BI, CD36 y LOX-1, así como receptores tipo toll (TLR). Es relevante destacar que este cambio en el fenotipo, desde la internalización de la LDL nativa, ocurre a un ritmo bastante lento para explicar la formación de células espumosas, y este proceso está sujeto a una regulación negativa por parte del receptor de LDL. En contraste, los receptores de captación de lípidos tienen una fuerte afinidad por la OxLDL y no están sujetos a regulación negativa,

lo que conduce a una acumulación significativa de lípidos intracelulares (Barbieri *et al.*, 2004), lo que resulta en la formación de células espumosas. Esta diferenciación de macrófagos que fomenta un ambiente proinflamatorio es parte de una "trampa de macrófagos", un ciclo vicioso que implica la retención celular, la oxidación de nuevas LDL y el reclutamiento adicional de monocitos (Park *et al.*, 2014). La OxLDL también estimula la activación de una serie de genes vinculados a la inflamación en los macrófagos, como MCP-1, amiloide A séricos, ceruloplasmina y hemoxygenasa-1 (Liao *et al.*, 1993). Además, esta activación de los macrófagos provoca la liberación de citocinas proinflamatorias, como la interleucina 1- β y el factor de necrosis tumoral, así como la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y metaloproteasas, que están asociadas con la progresión de la inflamación (Hansson *et al.*, 2006).

La internalización de OxLDL proporciona lípidos oxidados que actúan como ligandos para la vía PPAR- γ , lo cual estimula positivamente la expresión de CD36, facilitando así la internalización adicional de OxLDL (Nagy y Tontonoz, 1998). Este proceso activa los macrófagos, provocando la secreción de citoquinas que atraen células inmunes hacia la íntima y la liberación de enzimas como la mieloperoxidasa y la 12/15-lipoxigenasa, las cuales se cree que participan en la oxidación de nuevas LDL, incrementando la reserva local de OxLDL (Carr *et al.*, 2000). Además, la internalización de OxLDL a través de CD36 parece suprimir la migración de los macrófagos, promoviendo la propagación celular y la activación de la quinasa de adhesión focal, en un proceso mediado por src-quinasas y estrés oxidativo. También se observa que la interacción entre OxLDL y CD36 induce la pérdida de polarización celular en los macrófagos, un paso crucial para la

migración celular (Park *et al.*, 2009). Por lo tanto, la evidencia sugiere que OxLDL no solo contribuye a la diferenciación de monocitos y la activación de macrófagos, sino también a la retención de estos últimos. Además, LOX-1, uno de los receptores de captación de lípidos expresados en macrófagos, aumenta significativamente la absorción de OxLDL cuando es estimulado por citocinas proinflamatorias, OxLDL u otros estímulos, lo que favorece la formación de células espumosas (Pirillo *et al.*, 2013; Schaeffer *et al.*, 2009). La acumulación de OxLDL puede conducir a la apoptosis o necrosis de las células espumosas, generando restos celulares que se depositan en el núcleo de la placa aterosclerótica y contribuyen así a la progresión inflamatoria (Figura 2).

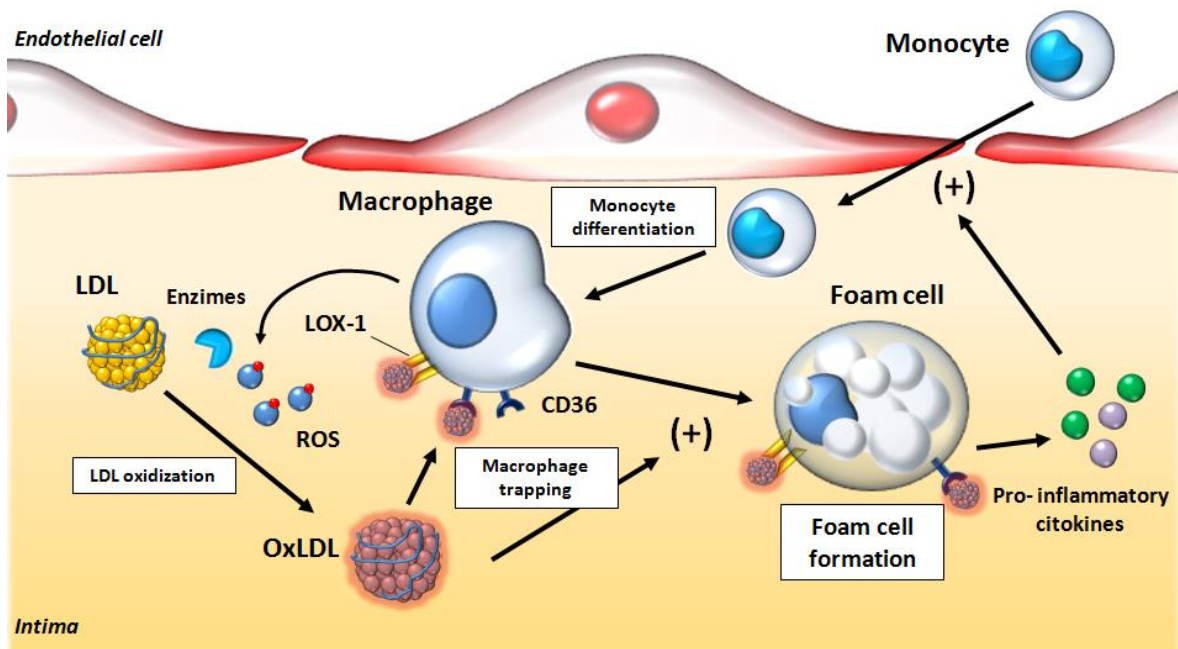


Figura 2: Papel de OxLDL en la formación de células espumosas (Leiva *et al.*, 2015)

3.3. Migración y proliferación de células de músculo liso:

La migración y posterior proliferación localizada de células musculares lisas (SMC) en la capa íntima son características clave del proceso ateromatoso y desempeñan un papel central en su progresión. Las SMC se desplazan desde la capa media hacia el espacio subendotelial, donde se multiplican en respuesta a factores de crecimiento. La proliferación de SMC puede ser estimulada por OxLDL, ya que estas partículas mejoran la expresión y liberación del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y del factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) (Kohno *et al.*, 1998; Stiko-Rahm *et al.*, 1992) por células endoteliales y macrófagos. Además, OxLDL también promueve la secreción de otros factores de crecimiento y sus receptores, como el factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF), todos con efectos mitogénicos que inducen la proliferación de SMC (Mitra *et al.*, 2011). Además, OxLDL induce cambios directos en las SMC, aumentando su migración y provocando modificaciones en su fenotipo para que produzcan grandes cantidades de matriz extracelular (ECM). La síntesis de colágeno intersticial y elastina conduce a la formación de una capa fibrosa que recubre la placa aterosclerótica en desarrollo, creando un "núcleo necrótico" que contiene células espumosas, restos celulares, lípidos extracelulares y enzimas lisosomales (Maiolino *et al.*, 2013). Por tanto, OxLDL contribuye a la expansión del tamaño de la lesión aterosclerótica.

Se ha observado que OxLDL induce la expresión de LOX-1 en células musculares lisas (SMC), y se ha sugerido recientemente que muchos de los efectos atribuidos a OxLDL están mediados por LOX-1 (Mitra *et al.*, 2011). Uno de los efectos importantes mediados por LOX-1 es el aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) inducido por OxLDL en las SMC, lo que puede ocasionar la muerte celular, contribuyendo así a la inestabilidad de la placa y su eventual ruptura en la fase avanzada de la aterosclerosis (Hsieh *et al.*, 2001). En resumen, la evidencia sugiere que OxLDL desempeña un papel crucial en la inestabilidad de la placa y, por ende, en el desarrollo de sus complicaciones (figura 3).

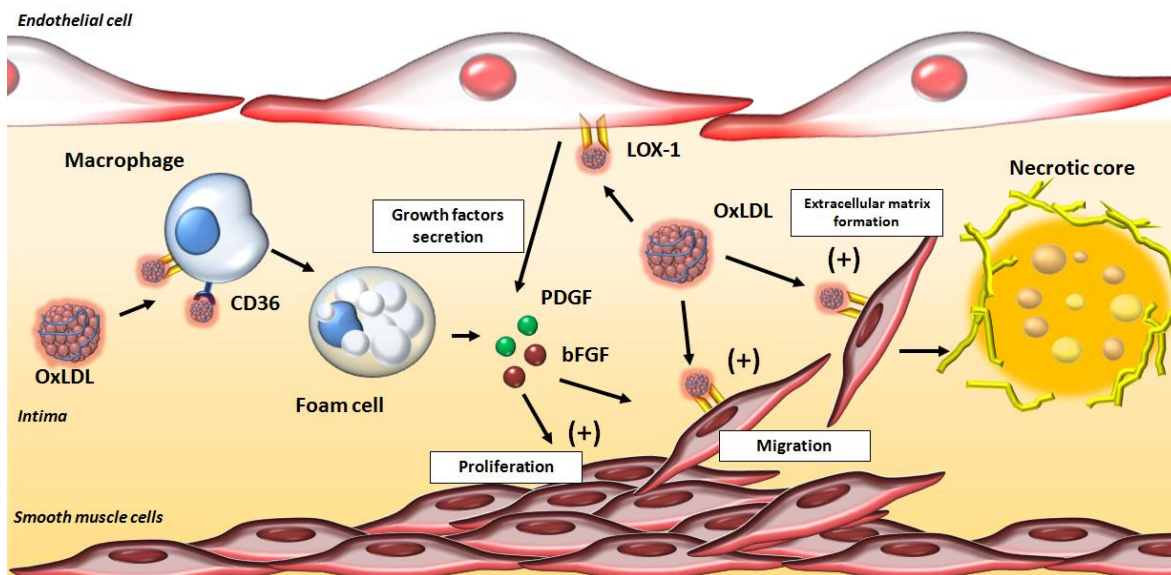


Figura 3: Papel de OxLDL en la proliferación y migración de células de músculo liso (Leiva *et al.*, 2015)

3.4. Inducción de la adhesión y agregación plaquetaria.

Después de la ruptura de la placa aterosclerótica, las plaquetas desempeñan un papel fundamental en la formación de trombos, y OxLDL también está involucrado en este proceso. La disminución de la producción de óxido nítrico (NO) endotelial debido a la presencia de OxLDL se ha asociado con un aumento en la secreción de prostaglandinas, lo que resulta en la agregación plaquetaria (Maiolino *et al.*, 2013). Se ha observado que el receptor CD36 está presente en las plaquetas en su estado de reposo, y su interacción con OxLDL se ha relacionado con la activación de las plaquetas, como se evidencia por la expresión de selectina P y la activación de la integrina α IIb β 3 (Podrez *et al.*, 2007).

La presencia de OxLDL parece generar una mayor actividad en las plaquetas, ya que cuando se exponen a OxLDL, muestran una mayor sensibilidad al clásico activador de plaquetas ADP, en un proceso que está regulado por miembros de la familia JNK y Vav (Chen *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2011). OxLDL tiene la capacidad de inducir cambios en la forma y activación rápida de las plaquetas mediante la activación de las vías de señalización de Src quinasas y Rho quinasa. Además, los efectos de OxLDL en las plaquetas podrían también contribuir a fenómenos adicionales pro-aterogénicos. Por ejemplo, las plaquetas expuestas a OxLDL liberan quimiocinas que promueven el desarrollo de la aterosclerosis y también facilitan la disfunción endotelial y la formación de células espumosas (Curtiss *et al.*, 1987; Daub *et al.*, 2010).

Una vez que las plaquetas se activan, se observa la expresión de LOX-1 en ellas, lo que contribuye a la internalización de OxLDL junto con CD36. Se ha sugerido que LOX-1, al ser capaz de unirse a los fosfolípidos aniónicos presentes en la superficie de las plaquetas activadas, podría mediar la adhesión de las plaquetas a las células endoteliales (CE) (Pirillo *et al.*, 2013). La interacción entre las plaquetas y LOX-1 mejora la liberación de endotelina-1 (ET-1) de las células endoteliales (Kakutani *et al.*, 2000) y también induce la inactivación oxidativa del óxido nítrico (NO) en estas células (Cominacini *et al.*, 2003), lo que sugiere que LOX-1 también participa en la disfunción endotelial a través de las plaquetas activadas. Por lo tanto, OxLDL parece tener un papel crucial en el comportamiento proaterosclerótico de las plaquetas activadas (figura 4).

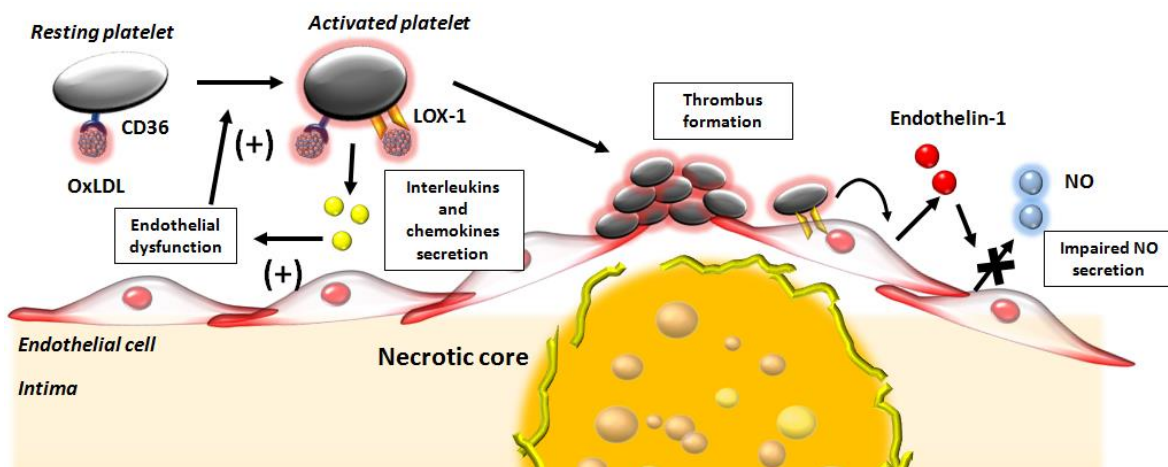


Figura 4: Papel de OxLDL en la función pro-aterosclerótica de las plaquetas
(Leiva *et al.*, 2015)

4. Modelos experimentales para el estudio de la aterogénesis

Los altos niveles de LDL son un factor determinante en la aparición de la aterosclerosis clínica, aunque la enfermedad puede desarrollarse incluso con niveles normales de LDL cuando se combinan con otros factores de riesgo como el tabaquismo, la presión arterial alta, la diabetes la susceptibilidad genética entre otros factores (Lim *et al.*, 2012; Yusuf *et al.*, 2004). Estos factores interactúan para facilitar el desarrollo de la enfermedad, que es multifactorial. Para estudiar y comprender los mecanismos subyacentes de la aterosclerosis, se han desarrollado numerosos modelos experimentales. Muchos de estos modelos emplean animales a los que se les induce la enfermedad mediante una dieta rica en lípidos. Además, se han creado modelos genéticamente modificados y se han utilizado modelos celulares para evaluar los efectos de agentes pro y antiaterogénicos (Leong *et al.*, 2015).

Entre las principales limitaciones en los estudios *in vivo* enfocados en la aterosclerosis, principalmente con animales murinos, están el tiempo y el costo requerido para desarrollar con precisión un modelo animal que imite la complejidad de la enfermedad humana. Para superar este problema, necesitamos un modelo vertebrado *in vivo* que permita la disponibilidad suficiente de individuos, en periodos de tiempo acotados, que sea fácil de manipular y a un costo relativamente bajo. Con el tiempo, diferentes modelo no murinos se han desarrollado para el estudio de esta enfermedad en diversos animales, tales como: nemátodos (*Caenorhabditis elegans*), ranas (*Xenopus laevis*), embriones

de pollo (*Gallus gallus*) y pez cebra (*Danio rerio*) (González-Moragas *et al.*, 2017; Giannaccini *et al.*, 2014). Sin embargo, algunos de estos modelos presentan diferencias significativas en la distribución y composición de las lipoproteínas en comparación con los humanos, lo que limita su utilidad para replicar la fisiopatología humana. El ratón se ha convertido en el modelo animal más utilizado en la investigación de la aterosclerosis debido a su bajo costo, alta prolificidad y facilidad de manipulación pero deficientes de ApoE/LDLR y los animales alimentados con una dieta rica en colesterol, exacerbaban la inflamación y favorecen respuesta adaptativas de los animales (Getz & Reardon, 2012; Ka *et al.*, 2021), lo cual no refleja el proceso en humanos. Aunque los modelos murinos presentan diferencias en las lesiones ateroscleróticas en comparación con los humanos, siguen siendo útiles para explorar los mecanismos moleculares de la enfermedad. Además, la posibilidad de realizar transgénesis y mutación dirigida en ratones los convierte en una herramienta poderosa en la investigación de la aterosclerosis.

Por parte, el pez cebra adulto (*Danio rerio*) ha demostrado ser un modelo extraordinario para evaluar y caracterizar la aterosclerosis *in vivo*, ya que estos animales desarrollan hipercolesterolemia muy fácilmente debido a su alta capacidad para absorber colesterol (Fang *et al.*, 2014). Así el pez cebra ha surgido como un modelo experimental emergente (Vargas, 2017). Aunque su anatomía vascular difiere de la de los mamíferos, el pez cebra ofrece ventajas únicas, como su transparencia óptica durante las etapas tempranas del desarrollo y una numerosa progenie de desarrollo externo (Valles *et al.*, 2018), lo que

permite la observación directa de los procesos de formación de placas ateroscleróticas (Fang *et al.*, 2014).

Además, la manipulación genética en el pez cebra es relativamente sencilla lo que facilita la investigación sobre los mecanismos subyacentes de la aterosclerosis (Fang *et al.*, 2014).

4.1. Modelo ratón

El uso del ratón en la investigación científica es invaluable debido a su reproducción eficiente, breves ciclos generacionales y mantenimiento económico. Estos animales son notables por sus líneas puras con fenotipos genéticamente transmisibles y su notable resistencia a la aterosclerosis (Paigen *et al.*, 1985). Desde el punto de vista del metabolismo de lipoproteínas, los ratones tienen una deficiencia en proteínas importantes como la transferidora de ésteres de colesterol y Apo (a) (Tall, 1993), y predominan en lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Chapman *et al.*, 1986). La raza C57BL/6J ha sido fundamental en los estudios de aterosclerosis que se inducen mediante dietas ricas en grasas saturadas y colesterol, además de ácido cólico (Nishina *et al.*, 1990). La adaptación de este modelo ha mejorado con el desarrollo de la tecnología transgénica y la manipulación genética, lo que ha propiciado progresos significativos en la simulación de enfermedades humanas (Casacuberta *et al.*, 1980).

4.2. Modelo rata

Las ratas son comúnmente empleadas en la investigación de laboratorio, particularmente en el estudio de lipoproteínas y arteriosclerosis, gracias a su mantenimiento económico y su capacidad para soportar procedimientos quirúrgicos complejos. No obstante, diferencias en el metabolismo lipoproteico entre ratas y humanos restringen su aplicabilidad en ciertos estudios relacionados con la aterosclerosis. Estos animales, que predominan en HDL y carecen de CETP y Apo (a), tienen un metabolismo que favorece una mayor conversión de colesterol en ácidos biliares ante dietas altas en colesterol, lo que les otorga una resistencia natural a la hipercolesterolemia (Dietschy *et al.*, 1993). Además, las ratas solo desarrollan aterosclerosis cuando son alimentadas con dietas altamente enriquecidas (Hadjisky *et al.*, 1991). Entre las variedades de ratas, las RICO y las Zucker obesas son modelos utilizados para investigar la hipercolesterolemia y el síndrome metabólico, respectivamente (Ouguerram *et al.*, 1991). Las variedades DOCA y SHR se utilizan en el estudio de la hipertensión y para evaluar la eficacia de agentes hipolipemiantes (Griendling *et al.*, 2003).

4.3. Modelo paloma

Este animal, bajo una dieta normal, presenta altos niveles de colesterol plasmático (300 mg/dl), con un predominio del transporte a través de HDL (hasta un 70%). Cuando se alimenta con una dieta enriquecida con 0,5% de colesterol y

10% de suero bovino, su colesterol plasmático puede escalar hasta los 2000 mg/dl, con un incremento notable en las lipoproteínas β -VLDL y LDL. Sin embargo, estos animales no poseen Apo E ni B-48 (Barakat *et al.*, 1985). En cuanto a las diferentes razas, la Show Racer (SR) resiste el desarrollo de aterosclerosis bajo dietas altas en colesterol (Jerome *et al.*, 1985), en contraste con la White Carneau (WC), que desarrolla aterosclerosis de manera espontánea con una dieta rica en granos. Esta susceptibilidad en la WC puede deberse a defectos hereditarios que afectan tanto la capacidad de los macrófagos para expulsar colesterol como a los transportadores intestinales encargados de su eliminación fecal (Yancey *et al.*, 1994). Las lesiones arterioscleróticas observadas en la WC ocurren en partes críticas como la aorta torácica y abdominal, así como en las arterias braquiocefálicas, ilíacas, carótidas, renales y coronarias, presentando una morfología y estructura ultra similar a las lesiones humanas, incluyendo células espumosas, depósitos de colesterol, acumulación de matriz extracelular y, en etapas avanzadas, calcificación y neovascularización, que pueden ulcerarse y formar trombos, llevando a un infarto de miocardio (Santerre *et al.*, 1972).

4.4. Modelo conejo

Anitschkow, hace 90 años, identificó la acumulación de colesterol en la aorta del conejo, estableciéndolo como un valioso modelo para estudiar la arteriosclerosis debido a su rápida formación de lesiones aórticas y su costo accesible

(Anitschkow *et al.*, 1913). Brousseau y Hoeg revisaron ampliamente este modelo (Brousseau *et al.*, 1999). Aunque el conejo comparte similitudes metabólicas con los humanos, como la presencia de CETP y una composición lipoproteica similar, difiere en aspectos como la ausencia de Apo A-II y una baja actividad de la lipasa hepática (Greeve *et al.*, 1993). La investigación en este modelo se enfoca en los efectos de diferentes niveles de colesterol en la dieta. Dietas con entre 0,5% y 4% de colesterol durante 8 a 16 semanas inducen hipercolesterolemia severa, con niveles plasmáticos superiores a 1.000 mg/dl, principalmente en LDL y β -VLDL (Schwenke *et al.*, 1989). Esto conduce a la formación de lesiones aórticas tempranas, como estrías grasas con células espumosas, que progresan a lesiones ateromatosas más complejas con el tiempo y la disminución del colesterol dietético (Ross *et al.*, 1978). La localización de estas lesiones varía según el nivel de colesterol en la dieta, siendo inferiores al 0,15% predominante en la aorta torácica superior. Las razas de conejos como la Watanabe y la St. Thomas' Hospital son relevantes debido a defectos genéticos que simulan condiciones humanas como la hipercolesterolemia familiar y la hiperlipemia combinada (Watanabe *et al.*, 1980). Algunas líneas seleccionadas de conejos Watanabe exhiben altos niveles de LDL y desarrollan placas ateromatosas en las coronarias (Shiomi *et al.*, 1992). Variantes específicas incluso muestran infartos de miocardio, a pesar de carecer de signos típicos de ruptura de placa y trombosis humanas (Shiomi *et al.*, 2003).

4.5. Modelo *Danio rerio*

El pez cebra (*Danio rerio*) ha emergido como un recurso valioso y versátil en numerosos campos científicos. Originario de aguas tropicales de agua continentales, el pez cebra es un organismo de pequeño tamaño con un ciclo de vida corto y una alta tasa de reproducción, lo que lo convierte en un modelo biológico ideal para estudiar la aterogénesis. Kimmel *et al* (1995) definieron las etapas del desarrollo embrionario y larval en el pez cebra en horas post fecundación (hpf), definiendo así una escala estándar de desarrollo a 28,5°C, lo que es posible debido a la alta sincronidad con que ocurre la embriogénesis de esta especie a temperaturas constantes. Esta uniformidad en las condiciones de crecimiento del pez que han podido ser replicadas por varios grupos de científicos ha permitido generar información morfológica, bioquímica y fisiológica en todas las etapas del ciclo de vida del pez cebra, tanto en el desarrollo embrionario y larval, como en juveniles y adultos de ambos sexos de esta especie. Las larvas se vuelven activas después de 3-5 días de ser fecundadas, y llegan a la madurez sexual alrededor de los 3 meses. La rapidez con la que se reproduce esta especie es una de las razones por las cuales es tan atractiva para la investigación científica (Cubillos, 2017; Espinosa, 2016). El pez cebra se destaca por su sistema inmune avanzado, el cual comparte y presentan similitudes con los humanos, destacan los macrófagos y neutrófilos por su importancia y características morfológicas y funcionales que se asemejan a las que se observan en mamíferos (Varela *et al.*, 2017). Así como los mamíferos, los teleósteos también tienen

diversos tipos de granulocitos y un linaje distinto de macrófagos. El neutrófilo es el granulocito más común en el pez cebra, al igual que en el humano y se distingue por su núcleo segmentado con 2 a 3 lóbulos. Este ejemplo de célula se asemeja al neutrófilo humano ya que también presenta un núcleo con varios lóbulos y un citoplasma heterofílico. A medida que el neutrófilo se desarrolla, sus gránulos también se desarrollan, liberando y almacenando múltiples enzimas esenciales para su desempeño. La actividad histoquímica de la mieloperoxidasa en los heterófilos del pez cebra muestra la presencia de la enzima peroxidasa en las células de los peces (Crowhurst *et al.*, 2002). Diversas investigaciones indican que los neutrófilos polimorfonucleares son las células inmunitarias innatas más abundantes, siendo el tipo de glóbulo blanco predominante en larvas de pez cebra a los 2 días de la fecundación, y también en mamíferos adultos (Trede *et al.*, 2004).

Los neutrófilos, un tipo de glóbulos blancos polimorfonucleares, son los primeros en llegar a las zonas inflamadas. La detección y medición de neutrófilos en tejidos se ha empleado extensamente como un marcador de inflamación en peces cebra, utilizando herramientas como pruebas citoquímicas y tinciones para visualización histológica (Hernández, 2019). La tinción Sudan Black B se describe como un colorante que tiene afinidad por fosfolípidos y esteroides, es insoluble en agua y puede teñir el citoplasma, lípidos neutros, fosfolípidos y colesterol de marrón oscuro a negro (Wang *et al.*, 2015). La coloración de los numerosos gránulos en los neutrófilos es más notable que en las células de otros tipos (Quan *et al.*, 2019), lo que la convierte en una herramienta útil para identificar la presencia de granulocitos y evaluar posibles reacciones inflamatorias. Tanto el pez cebra

(*Danio rerio*) como el ratón (*Mus musculus*) han surgido como modelos animales valiosos para el estudio de la aterogénesis. Cada uno ofrece ventajas únicas que complementan y amplían nuestra comprensión de este proceso complejo (Tabla 1), ya que la hipercolesterolemia observada en estos animales en términos de distribución de lipoproteínas es similar a la distribución observada en pacientes con dislipidemia (Otis *et al.*, 2015). Además, los genes asociados con el metabolismo lipídico se conservan entre humanos y peces, así se ha demostrado que ellos expresan SRA1, CD36, TLR4, LDLr, LRP-1 y ABCA-1 (González-Rosa *et al.*, 2022; Han *et al.*, 2021). El pez cebra y los humanos comparten similitudes en la manera en que absorben el colesterol en el intestino. El pez cebra tiene una versión de la proteína humana Niemann-Pick C1 (NPC1L1) llamada Npc1l1, que juega un papel en la absorción y transporte de colesterol en el intestino y es el blanco de la ezetimiba, un medicamento para reducir el colesterol. Los ácidos grasos presentes en la alimentación facilitan la captación de colesterol en el intestino al cambiar rápidamente la ubicación de Npc1l1 en el borde del cepillo intestinal (Walters *et al.* 2012).

La alimentación durante 10-14 días de larvas de pez cebra con una dieta alta en colesterol (4% o 8% de colesterol) resulta en hipercolesterolemia, acumulación de lípidos en la pared vascular, alteración de células endoteliales, aumento de la permeabilidad vascular, reclutamiento de células inflamatorias y activación de fosfolipasa A2 (Stoletov *et al.*, 2009). Por otra parte, dado que estos animales exhiben un grado de transparencia durante el desarrollo, es un modelo ideal para monitorear la absorción de lípidos, angiogénesis, activación del sistema inmune y

la formación de células de espuma (ver revisión Schlegel., 2016; Han *et al.*, 2021). Además, la transparencia óptica en estados embrionarios y larvales, permite obtener imágenes de proteínas y sondas fluorescentes en tiempo real como ésteres de colesterol fluorescente (rojo) o células endoteliales marcadas en modelos de pez cebra transgénicos como la línea reportera Tg (fli1:EGFP) (Han *et al.* 2021). Los modelos de ratones y conejos transgénicos mantenidos con una dieta alta en grasas son costosos y difíciles de monitorear en tiempo real, por lo que el modelo de aterosclerosis en pez cebra supera estas desventajas. Además, los eventos ateroscleróticos se desarrollan más rápidamente en el pez cebra en comparación con otros modelos animales, por lo que este modelo permite una progresión adecuada del fenómeno aterogénico. En forma importante, alrededor del 70% de los genes identificados en humanos tienen al menos un ortólogo de pez cebra (Howe *et al.*, 2013) y los genes asociados con la ECV en humanos se conservan con los genes ortólogos de este pez (Lee *et al.*, Khor *et al.*, 2019, Zhan 2018). Por lo tanto, no sorprende que una amplia gama de medicamentos cardiovasculares para humanos usados en la práctica clínica diaria tiene efectos análogos en el corazón y los vasos sanguíneos del pez cebra, validando el uso del pez cebra como modelo en la investigación cardiovascular (Child *et al.*, 2000; Driever *et al.*, 1996; Anderson *et al.*, 2011).

La tabla 1 resume y compara las principales características y ventajas de los modelos de aterosclerosis en el ratón y el pez cebra.

Característica	Ratón	Pez Cebra
Facilidad de crianza	+++ Reproducción relativamente rápida y homogeneidad de la descendencia	++++ Gran cantidad de embriones con el mismo trasfondo genético podrían obtenerse en un corto período de tiempo (hasta 500 por semana de una pareja)
Instalación de mantenimiento	+++ Una variedad de sistemas de alojamiento, incluidos algunos automatizados. Consumo de material relativamente alto	++++ Sistemas de alojamiento automatizados con bajo consumo de material y costos laborales relativamente bajos
Facilidad del modelo	++ Amplia variedad de modelos genéticos estudiados.	++++ sin manipulación genética es suficiente para inducir hiperlipidemia sin manipulaciones genéticas, la edición del genoma también está disponible
Control del estado microbiológico	+++ Programas de monitoreo de salud estandarizados. Recomendaciones grandes	+ Recomendaciones ambiguas, mayores riesgos debido a la sensibilidad de las larvas ante patógenos potenciales en el agua circulante
Variedad de métodos de investigación.	+++ Métodos histopatológicos y bioquímicos ampliamente utilizados	++++ Embriones y larvas son ópticamente transparentes, lo que permite la monitorización y observación no invasivas <i>in vivo</i> . Posibilidad de realizar histoquímica en el animal completo. Cierta dificultad para recolectar muestras de tejido debido al pequeño tamaño del modelo.
Similitud con la fisiopatología de la aterosclerosis humana	++ La mayoría de los modelos no manifiestan placas ateroscleróticas inestables con trombosis superpuesta, rara vez desarrollan aterosclerosis en las arterias coronarias, pero desarrollan fácilmente aterosclerosis en la raíz aórtica.	+++ Sistema vascular y digestivo desarrollado. hipercolesterolemia en comparación con los mamífero
Similitud con el patrón lipídico humano	++ Relativamente resistentes al desarrollo de aterosclerosis debido a características específicas del perfil lipídico, los modelos dependen de la generación de una hipercolesterolemia no basada en no-HDL.	++ Ortólogos de factores clave que regulan el metabolismo lipídico - MTTP, slc27a, ACS, APOC2 están presentes. La proteína leptina y su receptor no se expresan en el tejido adiposo del pez cebra.

Tabla 1: Ventajas y limitaciones de los modelos de ratón y pez cebra para la investigación de la aterosclerosis y la dislipidemia. + + + + nivel más alto de ventaja; + nivel más bajo de ventaja. (Vasyutina *et al.*, 2022)

En resumen, el pez cebra es un modelo vertebrado único que no sólo tiene las características de los modelos de invertebrados (pequeño tamaño, potente manejabilidad genética, alta fecundidad, facilidad de mantenimiento, y relativamente bajo costo) sino también la ventaja de ser un vertebrado y presentar una alta conservación con los mamíferos. Por lo tanto, su uso es invaluable para estudiar el desarrollo y fisiología de vertebrados, así como modelo de enfermedades humanas, tales como la aterogénesis y la enfermedad cardiovascular.

Por todo lo anterior, en esta tesis se buscó desarrollar un modelo de aterogénesis temprana en larvas de pez cebra que permita en el futuro, probar inhibidores de la aterosclerosis *in vivo* para prevenir así las complicaciones cardiovasculares.

En el desarrollo de esta tesis se evaluará:

- 1) Efecto de una dieta alta en grasa sobre la acumulación de lípidos en larvas de pez cebra.
- 2) Parámetros morfométricos y bioquímicos del metabolismo lipídico y la función hepática, en el modelo de pez cebra.
- 3) El reclutamiento de granulocitos en la región perivascular de los vasos mayores en larvas de pez cebra.

PROBLEMA

Los modelos *in vitro* e *in vivo* que han sido ampliamente utilizados para el estudio de la aterosclerosis, no permiten tener una idea clara de su complejidad, a lo largo de la vida de un individuo y en un entorno fisiológico real, por lo tanto es necesario el desarrollo de un modelo que replique de mejor manera y en un tiempo acotado, el proceso que ocurre en humanos, especialmente las etapas tempranas de la enfermedad, previo a la aparición de signos clínicos.

PREGUNTA

¿Es posible replicar en larvas de pez cebra el proceso de aterogénesis temprana observado en humanos?

HIPÓTESIS

En resumen,

- 1.- La aterosclerosis es una enfermedad multifactorial en donde los mecanismos celulares y moleculares que la originan son complejos y no están completamente definidos.
- 2.- Ausencia de modelos establecidos *in vivo* adecuado para estudiar la aterogénesis temprana y la enfermedad cardiovascular.
- 3.- Los eventos patológicos involucrados en la aterogénesis temprana del pez cebra son similares a los descritos en humanos.

Con estos antecedentes, nuestra hipótesis es la siguiente:

“Las larvas de pez cebra alimentados con una dieta alta en grasa desarrollan lesiones aterogénicas tempranas y su uso como modelo permitirá estudiar la progresión de las etapas tempranas de la aterosclerosis”.

OBJETIVOS:

1. Objetivo general

Desarrollar un modelo de aterogénesis temprana en larvas de pez cebra usando una dieta alta en colesterol.

2. Objetivos específicos

1.- Determinar cambios en parámetros bioquímicos y en el crecimiento de larvas de pez cebra alimentadas con una dieta aterogénica.

2.-Cuantificar la acumulación de lípidos y granulocitos en la región periférica al el sistema vascular de larvas de pez cebra alimentadas con una dieta aterogénica.

3.- Evaluar la acumulación de lípido en hígado de larvas del pez cebra, alimentadas con una dieta aterogénica.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Aprobación ética

Este estudio se apegara a los lineamientos éticos establecidos por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales con código proyecto 20230009131INT VRID UDEC.

2. Modelos animales:

Los individuos de pez cebra fueron criados y mantenidos en el Laboratorio de Embriotoxicología e Interacción Desarrollo Ambiente (LEIDA) dirigido por la Dra. Javiera De la Paz Montt, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción. Todos los embriones se recolectaran mediante desove natural y serán mantenidos según los protocolos estándar para la especie (Westerfield, 2000). La edad de las larvas se expresarán en días post-fecundación (dpf) según Kimmel *et al.*, 1995.

3. Bioseguridad

Debido a la utilización de muestras biológicas para esta investigación, se tomarán las medidas de bioseguridad necesarias para evitar cualquier accidente y contaminación con ellas, siguiendo el protocolo que entrega MATPEL para el manejo de accidentes con material de riesgo biológico de la Universidad de Concepción. Los procedimientos realizados en el laboratorio se llevarán a cabo con elementos de protección personal (delantal y guantes). Los materiales ocupados, serán desechados en los contenedores correspondientes y previamente inactivados con una solución de hipoclorito de sodio al 1%, bajo las normas que estipula el laboratorio de Bioquímica Clínica e Inmunología de la Universidad de Concepción (anexo 1).

4. Mantención de peces cebra

Los peces cebra adulto de las cepas silvestres AB, TAB5 y WT se mantuvieron en acuarios a 26-28 °C, pH 7,0-7,4 , bajo un ciclo de 14:10 horas de luz/oscuridad. Las larvas de pez cebra se obtendrán por desove natural introduciendo cajas con doble fondo en los tanques de peces adultos reproductores. Estos peces adultos serán seleccionados cuidando que no hubiesen sido sometidos a estrés o a un desove en la última semana; para así cuidar la calidad y tamaño del desove. Las ovas recolectadas fueron

inspeccionadas mediante una lupa y se excluyeron las que no estaban fecundadas, embriones anormales o coagulados. Una vez obtenidos los embriones viables se mantuvieron hasta los 5 días post fecundación (dpf) en placa Petri con medio E3 (NaCl 5mM; KCl 0,17mM; CaCl₂ 0,33mM; MgSO₄ 0,33mM) con azul de metileno (0,5 ppm) para evitar contaminación fúngica.

Se seleccionaron 95 ovas y se colocaron en una placas Petri por triplicado en la siguientes condiciones: dieta control (FM), dieta control más dietiléter (FMD) y dieta control más dietiléter con colesterol al 4% (FMDCOL). Para su desarrollo sincrónico se utilizó una incubadora con fotoperiodo (VELP) a 27-28°C. Diariamente se realizó la limpieza a las placas eliminando cualquier impureza que apareciera en el medio, individuos muertos. O que presentaran malformaciones (edemas, curvaturas en la notocorda, etc).

5. Preparación de las dieta

Para la alimentación de las larvas, se preparó una dieta con base proteica de harina de pescado (HP) de acuerdo a lo descrito por Fehrmann-Cartes *et al* (2019). A partir de la dieta HP, se generó una dieta alta en colesterol (FM-COL) de acuerdo a lo descrito por Stoletov *et al* (2009), brevemente se mezcló el alimento FM con una solución de colesterol (Sigma-Aldrich C8667) disuelto en éter dietílico (Sigma), con el objetivo de alcanzar un contenido de colesterol 4% peso/peso en el alimento después de la evaporación solvente. De manera

adicional se generará una dieta FM-solvente con dietileter (FMD) como control de vehículo. Las dietas utilizadas fueron pasadas por tamiz de tal forma que el tamaño de partícula sea $<200\ \mu\text{m}$, posteriormente fueron almacenadas a $-20\ ^\circ\text{C}$ hasta su uso en los ensayos de alimentación.

6. Grupos experimentales:

Al llegar al estadio larval de 5 dpf los tres grupos se traspasaran a cajas plásticas de 200 mL con agua filtrada a una temperatura de $27-28\ ^\circ\text{C}$, pH 7,0-7,4 y una conductividad de $700-800\ \mu\text{S/cm}$. Los tres grupos FM, FMD y FMDCOL, por triplicado se alimentaron dos veces al día. Para cada grupo se realizó una limpieza extrayendo las larvas con una malla de $500\ \mu\text{m}$ y se traspasaron a placas Petri con agua de acuario filtrada y bajo un esteroscopio con aumento total 40x se eliminó cualquier impureza. Posteriormente, se colocaron las larvas en cajas limpias con agua fresca filtrada del sistema, y luego por la tarde se realizó una segunda alimentación y un recambio de un 50% del agua filtrada. Las cajas se mantuvieron en la incubadora, repitiendo este procedimiento por 10 días, finalmente, al terminar el periodo de tratamiento, se utilizó solución de tricaina al 0,03% (MS-222) para inducir la anestesia previo a cualquier tratamiento u observación *in vivo*; y se aplicó la eutanasia usando una sobredosis del mismo anestésico previo a los otros análisis realizados (O'Hare et al., 2014).

7. Mortalidad y Determinación de Parámetros de Crecimiento:

Para evaluar la mortalidad en los grupos experimentales, se registró diariamente la cantidad de muertes acumulada de las larvas de pez cebra, hasta los 10 días de alimentación. En el término del tratamiento se seleccionarán 20 larvas de cada tratamiento que tras ser anestesiadas, fueron colocadas en una placa con metilcelulosa. Se capturaron imágenes de campo claro con ayuda de una Cámara Réflex Digital 10.2 MP (NIKON, D3000) acoplada al esteroscopio (ZEISS, Stemi 508) con aumento 4x. Las larvas fueron fotografiadas desde una vista lateral para medir longitud desde la boca hasta última porción de la notocorda (cola), dorso ventral y ancho tronco (Han *et al.*, 2021).

8. Medición de parámetros bioquímicos

Posterior al tratamiento, se seleccionaron 40 larvas de pez cebra de cada tratamiento, que fueron sacrificadas y lavadas con solución salina enfriada (PBS) y luego homogeneizadas con 270 μ L de solución PBS-EDTA, para posteriormente centrifugar a 4°C y 2500 rpm durante 10 min. El sobrenadante se usó para determinar la Alanina aminotransferasa (ALT), Aspartato aminotransferasa (AST), Tiempo de protrombina (TP), Albúmina (ALB), Bilirrubina (TBIL), Bilirubin directa (DBIL), Gamma-glutamyl transferasa (GGT), Fosfatasa alcalina (ALP), Lactato deshidrogenasa (LDH), Glucosa (GLU), Triglicéridos (TG), Colesterol total (TC), Lipoproteínas de alta densidad (HDL), Proteína C reactiva (CRP). Mediante

métodos colorimétricos estandarizados en el Dpto. de Bioquímica Clínica e Inmunología Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción (Reyes et al., 2022).

9. Conteo de granulocitos

Para la tinción de granulocitos en larvas completas se utilizó el colorante Sudan Black B (SBB). Para su preparación se disolvieron 0,6 g de Sudan black B en 200 mL de etanol (EtOH) y se agitaron con calor hasta su completa disolución, posteriormente la solución se pasó por un filtro de 0,2 μm , la solución se mantuvo a temperatura ambiente y oscuridad. El conteo de granulocitos se realizó sobre larvas de pez cebra enteras en un portaobjeto con PBS y cubiertas con un cubreobjetos utilizando topes de plasticina para no aplastar a los individuos. Luego se observó en la zona de la vena cardinal y sin necesidad de tomar fotografías, se realizó un conteo en un área predefinida que consideró la región ventral de tres somitos anteriores al ano según esquema de la figura 8. Para visualizar los granulocitos teñidos con SBB se utilizó una lupa con aumentos de 20x y 40x.

10. Gránulos de lípidos en hígado del pez cebra

Después del tratamiento se seleccionaron 40 larvas de cada tratamiento para la visualización de gránulos de lípidos en el hígado. Esto se realizó en tubos eppendorf de 2 ml fijados en formalina (PFA) 10% durante toda la noche.

La acumulación de lípidos fue detectada mediante una doble tinción con Sudan Black B más aceite red-O (RO), que permitió observar la acumulación de lípido en el hígado. Para la preparación del RO se disolvieron 0,05 g en 10 mL de Propilenglicol 100% (PG) y se agitó hasta su completa disolución. Luego de eso, se filtra la solución con una malla de 300 μ m y se utiliza inmediatamente.

Para evidenciar el daño hepático se midió el tamaño de los gránulos de lípidos contenidos en el hígado de las larvas de pez cebra, a través de la medida del área de estos. Para esto se diseccionaron los hígados de larvas de 15 dpf que fueron expuestas para cada tratamiento de alimentación FM, FMD y FMDCOL y posteriormente teñidas con Sudan Black B y Aceite red-O (SBB+OR, Anexo 1).

Este procedimiento se hizo bajo lupa y con ayuda de agujas de disección elaboradas con alfileres entomológicos y pinzas. Una vez obtenidos los hígados, se procedió al montaje de grupos de no más de 10 hígados en un portaobjeto, inmersos en glicerol 80%, y tras cubrirlos con un cubre objeto, se sellaron de tal forma que se mantuvieran en el tiempo. Para el análisis de gránulos fue necesaria la obtención de imágenes, las que se realizaron con un microscopio de campo claro (UPRIGHT) con un aumento de 100x. Se obtuvieron fotografías por cada hígado con distintos planos de enfoque fino, para poder considerar los gránulos

de lípido presentes en la profundidad de todo el tejido. El procesamiento de imágenes se realizó con el software gratuito ImageJ; las imágenes se convirtieron a 8 bits y binarizaron para que el programa pudiera determinar el porcentaje de área ocupada por píxeles negros (gránulos) o blancos (vacío) al seleccionar una región específica.

11. Análisis estadístico.

Previo aplicación de pruebas de normalidad y homocedasticidad, se usó análisis de varianza (ANOVA) de una vía para determinar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Se usará la corrección de Bonferroni para ajustar comparaciones múltiples. Los resultados se expresarán como media $\pm$ SD. Se compararon las medidas entre tratamientos de cada caso, siguiendo estadística paramétrica por medio de un test ANOVA o no paramétrica utilizando la prueba de Kruskal-Wallis o Mann-Whitney, según corresponda. Se consideró un valor de $p < 0,05$ para establecer diferencias significativas. Para todos los análisis se utilizó el software GraphPad Prism, LLC (versión 8.0.2).

RESULTADOS

1. Mortalidad:

En la figura 5 se muestran los datos de la mortalidad promedio de larvas para cada tratamiento en donde se contabilizaron las muertes acumulada dentro de los 10 días de alimentación con una base proteica de harina de pescado (FM y FMD) y un contenido en colesterol alto al 4% (FMDCOL). No se observan datos significativos entre las dietas estudiadas, sin embargo hay un aumento en mortalidad a partir del día 6 de alimentación y este aumenta progresivamente en el tiempo, observándose una mayor mortalidad en el grupo alimentado con la dieta alta en colesterol, en comparación con las dietas control

2. Crecimiento de larvas de pez cebra.

Para evaluar el crecimiento de las larvas, se realizaron mediciones en 20 larvas para cada dieta de alimentación a partir de imágenes capturadas. Se midió Longitud larval (LT), longitud dorso ventral (DV) a la altura del hígado y longitud ancho tronco (AT) a la altura del ano. Se midió a través del software imageJ y se realizó una conversión de píxeles a milímetros. Como se muestra en figura 6, la dieta alta en grasa genera un aumento la Longitud larval (LT), dorso ventral (DV) ancho tronco (AT), constituyendo un factor de riesgo para la obesidad.

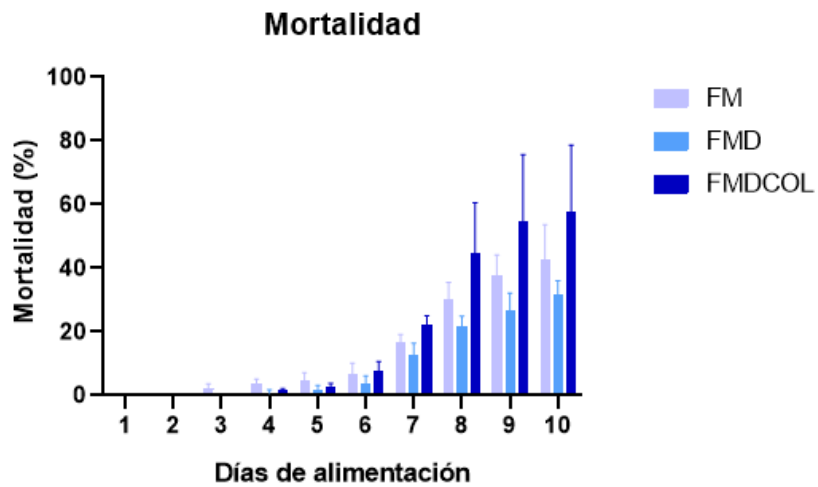
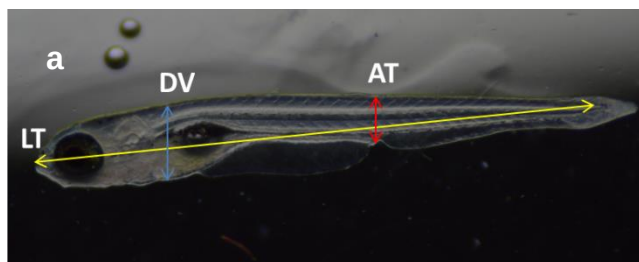
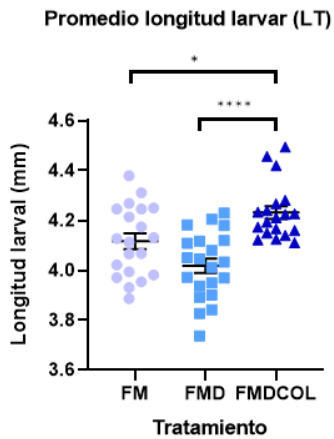
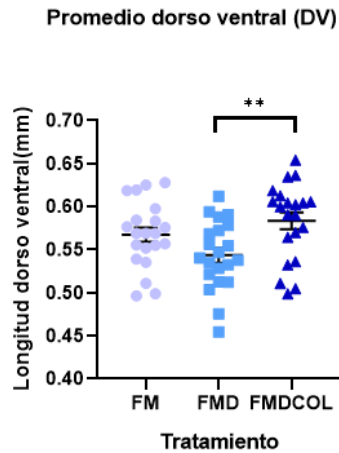
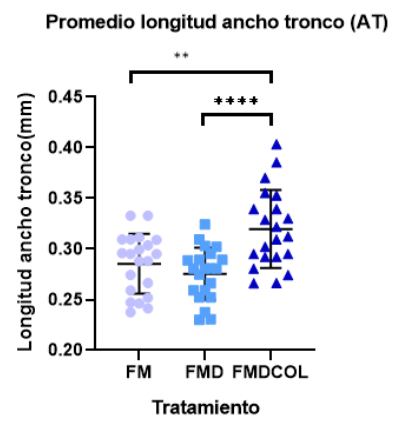


Figura 5: Mortalidad porcentual acumulada para larvas pez cebra alimentadas con dieta alta en grasa. La muerte acumulada de larvas de pez cebra alimentadas con los distintos tipos de dieta, fue determinada por análisis morfológicos de los animales por 10 días pos fecundación.



b**c****d**

alimentadas con una dieta control (HP), una dieta alta en colesterol (FM-Col) y dieta más solvente (FMD) por 10 días, posteriormente se midió la Longitud larval (LT), dorso ventral (DV) ancho tronco (AT) por fotografía utilizando una Cámara Réflex Digital 10.2 MP (NIKON, D3000) acoplada al esteroscopio (ZEISS, Stemi 508) con aumento 4x. En 7b * $p=0,02$, **** $p < 0,0001$, 7c * $p=0,0066$ y 7d * $p=0,002$, **** $p < 0,0001$.

3. Descripción del Perfil Bioquímico

Para evaluar el efecto del dieta sobre parámetros bioquímicos, se utilizaron 40 larvas de pez cebra, por duplicado, y los parámetros bioquímicos fueron determinados por métodos colorimétricos (Stoletov *et al.*, 2009). En la tabla 2 se resume el perfil hepático para los animales alimentados con las dietas FM, FMD y

FMDCOL. Nuestros resultados muestran que los niveles de Alanina aminotransferasa (ALT), Albúmina (ALB), Bilirrubina (TBIL), Bilirrubina directa (DBIL), Gamma-glutamyl transferasa (GGT) y Fosfatasa alcalina (ALP) no fueron diferentes en los tres grupos estudiados. Al comparar la dieta FMDCOL v/s FMD, las concentraciones de Aspartato aminotransferasa (AST), Tiempo de protrombina (TP) y Lactato deshidrogenasa (LDH) fueron significativamente mayores. Por otro lado, en la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos para el perfil lipídico en los tres grupos de dietas, no se observaron diferencias significativas para la concentración de Triglicéridos (TG), Colesterol total (TC) y Lipoproteínas de alta densidad (HDL) entre los grupos estudiados.

Al cuantificar los niveles de glucosa y Proteína C reactiva (PCR) en estos tres grupos, no se observaron diferencias significativas en la concentración de glucosa (FM, 2 ± 0 mg/dl, FMD, 3 ± 0 mg/dl y FMDCOL 2 ± 0 mg/dl), sin embargo la concentración de PCR aumenta significativamente (FM, $0,7 \pm 0,3$ mg/dl, FMD, $0,5 \pm 0,4$ mg/dl y FMDCOL $1,5 \pm 0,15^*$)

Tabla 2: Perfil hepático de larvas pez cebra alimentado con dieta alta en grasa.

	FM	FMD	FMDCOL
PARÁMETRO (mg/dL)	media $\pm$ SD	media $\pm$ SD	media $\pm$ SD
Alanina aminotransferasa (ALT)	6 ± 0	7 ± 0	4 ± 4

Aspartato aminotransferasa			
(AST)	68 ± 6	71 ± 6	87,5 ± 0,5*
Tiempo de protrombina (TP)	0	0,1 ± 0	4,55 ± 4,45*
Albúmina (ALB)	0,15 ± 0	0,17 ± 0	0,17 ± 0,02
Bilirrubina (TBIL)	0,25 ± 0	0,23 ± 0,13	0,17 ± 0,07
Bilirubina directa (DBIL)	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Gamma-glutamyl transferasa			
(GGT)	1,5 ± 0	2 ± 2	2,5 ± 0,5
Fosfatasa alcalina (ALP)	31,5 ± 0	50 ± 21	34 ± 7
Lactato deshidrogenasa			
(LDH)	51,5 ± 0,5	92 ± 13	107 ± 36*

Tabla 3: Perfil lipídico en larvas pez cebra alimentadas con dieta alta en grasa

	FM	FMD	FMDCOL
PARÁMETRO (mg/dL)	media ± SD	media ± SD	media ± SD
Triglicéridos (TG)	27 ± 2	27,2 ± 0,75	26,6 ± 1,1
Colesterol total (TC)	10 ± 2	11,4 ± 6	11,45 ± 0,6
Lipoproteínas de alta densidad			
(HDL)	0,98 ± 0,02	1,24 ± 0,1	1,32 ± 0,04

4. Identificación de acumulación de lípidos y granulocitos en el sistema vascular.

La tinción Sudan Black B, corresponde a un colorante que posee una gran afinidad por los fosfolípidos y esteroides, es insoluble en agua y puede teñir de color marrón oscuro o negro el citoplasma, los lípidos neutros, los fosfolípidos y el colesterol (Wang *et al.*, 2015). Se ha reportado que una abundante tinción es detectada en gránulos presentes en los neutrófilos más que en otras células (Quan *et al.*, 2019) por lo que esta tinción se considera una buena herramienta para evaluar si existe una reacción inflamatoria a través de la detección de la presencia de neutrófilos.

En la figura 7 se muestra una imagen representativa del sistema vascular de la larva de pez cebra, podemos visualizar el hígado, los vasos intersegmentados, vena cardinal y la arteria, en el recuadro rojo se muestra una pequeña porción de tres somitos, segmentos musculares que se encuentran delimitados por vasos intersegmentales.

En la figura 8 se muestra una imagen representativa de una reacción positiva para sudan black en los distintos grupos de estudio. Mediante observación bajo una lupa se evaluó la acumulación de lípidos en los tres grupos estudiados. En los grupos de animales tratados con la dieta FM y FMDCOL no hubo cambios en la tinción, pero si se observaron diferencia en la dieta alta en colesterol (FMDCOL).

Al aumento en 20x se visualizó una mayor tinción en los vasos intersegmentales, venas y arterias (sistema vascular), que sugieren una acumulación de lípidos.

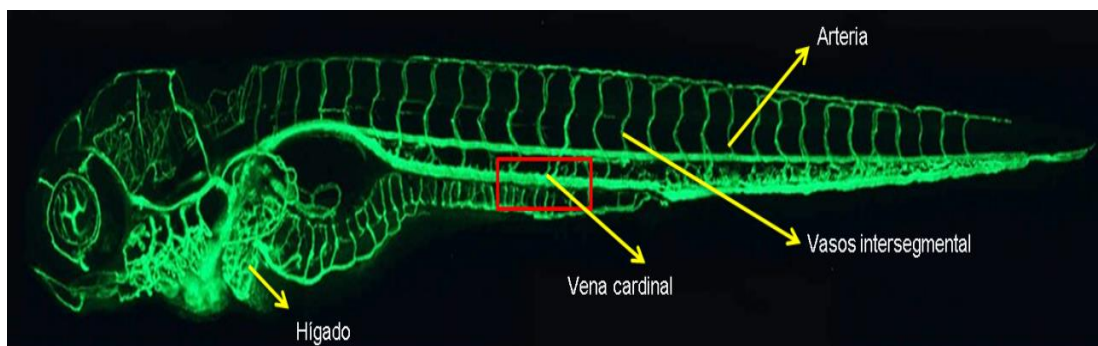


Figura 7: Sistema vascular de larvas de pez cebra (Galanternik *et al.*, 2020). Imagen representativa de la red vascular de un pez cebra. El rectángulo en rojo muestra la zona en donde se procedió a contar el número de granulocitos.

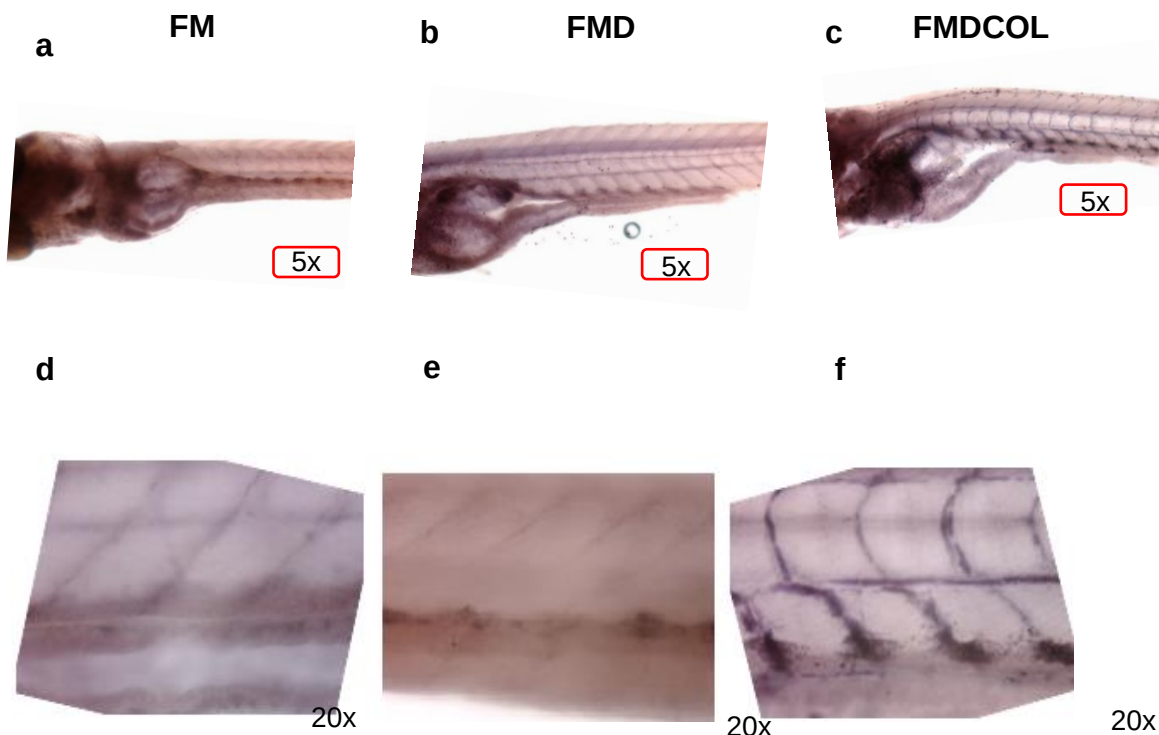


Figura 8: Depósito de lípido en el sistema vascular en larvas pez cebra alimentadas con dieta alta en grasa. En la figuras de la izquierda muestra la dieta de alimentación control (FM), centro tratamiento control más dietiléter (FMD) e izquierda tratamiento de dieta alto en colesterol (FMDCOL) y su imagen binarizada con ImageJ. El área total representa un porcentaje de espacio negro o blanco, utilizada tinción sudan black que permite visualizar lípidos acumulados en la vasculatura de las larvas completas. Se observa una mayor acumulación de lípidos para la dieta alta en colesterol. 8a, 8b y 8c, aumento 5x; 8d, 8e y 8f, aumento 20x.

5. Análisis cualitativo de lípido total en el sistema vascular

Para evaluar los depósitos de lípidos en el sistema vascular, se utilizó como criterio la intensidad de color visual de la tinción SBB, donde el 1 indica poco intenso, 2 relativamente intenso y 3 muy intenso de la figura en larvas completas con la tinción SBB (N=15).

El análisis cualitativo de los datos mostrados en el gráfico de la figura 9 muestra el nivel de acumulación de lípido en el sistema vascular, se observa un aumento significativo entre las dietas control y FMD v/s FMDCOL.

Clasificación de lípidos en el sistema vascular

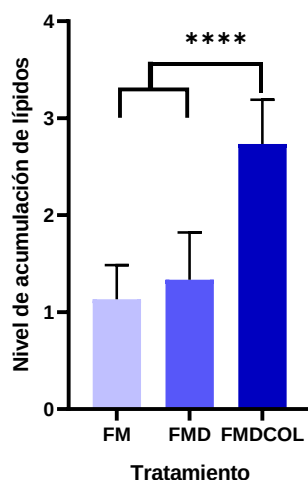


Figura 9: Acumulación de lípido en el sistema vascular de larvas pez cebra alimentadas con dieta alta en grasa. Cuantificación de la acumulación de lípidos de los datos presentados en la figura 8. (N=15), Test ANOVA ,****p<0.0001.

6. Conteo de granulocitos

Se escogieron 20 individuos por grupo y usando la tinción SBB y con ayuda de una lupa con aumento de 20x y 40x, se visualizó y se contó el número de granulocito en l región predefinida de la vena cardinal (zona roja) (ver figura 8).

En la figura 10a se muestra un granulocito presente en la zona de la vena cardinal de larvas de pez cebra. Es posible distinguir la presencia de múltiples gránulos en su citoplasma, con diferente afinidad tintorial. Asimismo, los granulocitos tienen un núcleo lobulado con características distintivas en número y forma de los lóbulos.

En la figura 10b se muestra el análisis cuantitativo del número de granulocitos presentes las larvas de pez cebras alimentadas con dieta control (FM y FMD) y

alto contenido en colesterol (FMCOL). Se observaron diferencias significativas al comparar las larvas alimentadas con un alto contenido en colesterol (FMDCOL) v/s FMD y FM, lo cual sugiere la presencia de una respuesta a la inflamación asociado al inicio de la enfermedad de aterogénesis

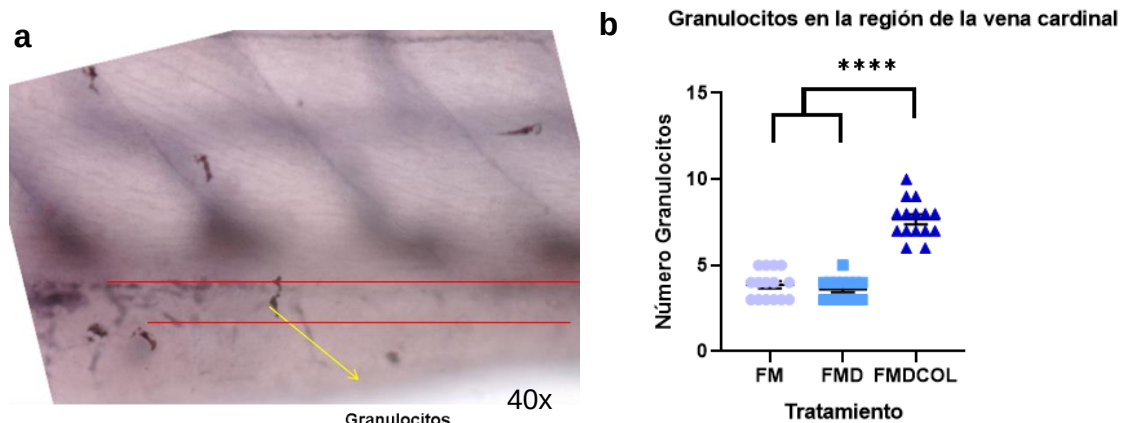


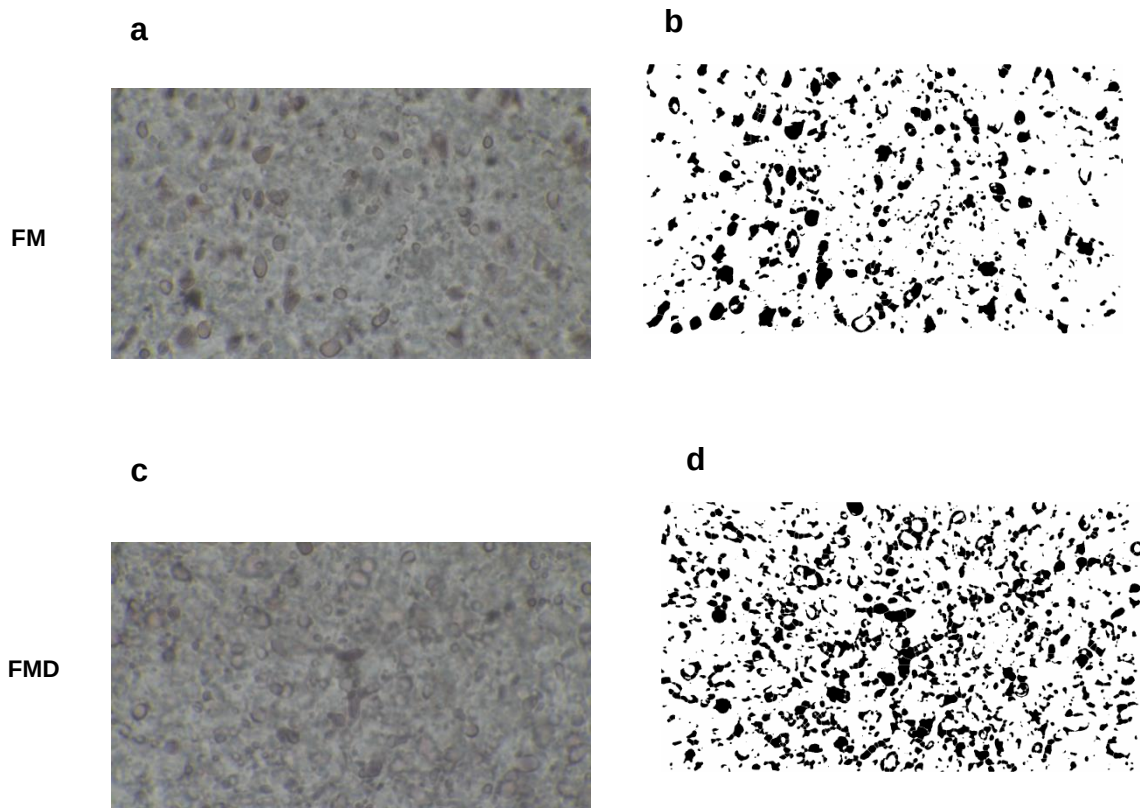
Figura 10: Cuantificación de granulocitos en la región de la vena cardinal en larvas pez cebra alimentadas con dieta alta en grasa. Los animales de los diferentes grupo fueron fijados en formalina y teñidos con sudan black, como se muestra en (a). En (b) se grafica el recuento de granulocitos contado para los tres tratamientos (N=20). Test ANOVA ****p < 0,0001.

7. Densidad de gránulos de lípidos en hígado

Para evaluar el depósito de lípidos en los hígados de los animales, se extirparon los hígados de pez cebra y usando doble tinción (SBB-RO) que permite identificar grasas neutras, ácidos grasos y triglicéridos de un color rojo-anaranjado. En la figura 11 a y c se muestra el hígado de animales alimentados con una dieta

normal, se muestra gránulos de lípidos pequeños en comparación con los animales tratados con una dieta alta en grasa (11 e). Además, estos muestran, un mayor tamaño de lípidos, lo que podría asociarse con esteatosis hepática.

El análisis cuantitativo de los datos mostrados en la figura 11, se observa el tamaño de gotas de lípidos en hígado diseccionados para las diferentes dietas, se observa un cambio significativo entre las dietas control v/s FMDCOL, sugiriendo que el hígado está cursando en proceso inflamatorio (figura 12), lo cual se correlaciona con los niveles de enzimas hepáticas y PCR.



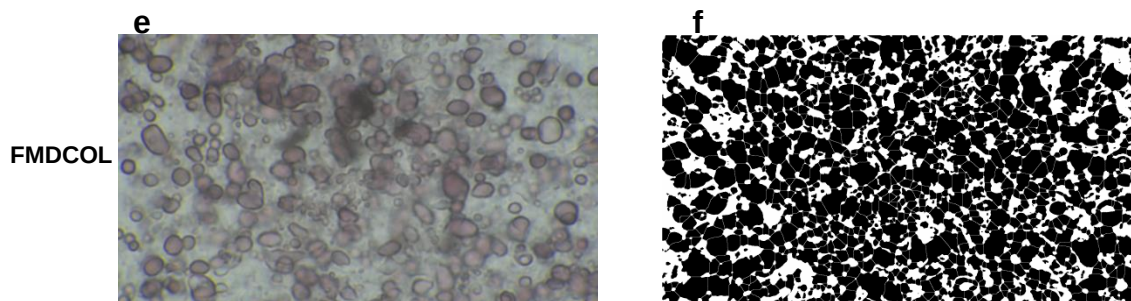


Figura 11: Densidad de gránulos de lípidos en hígado diseccionado desde larvas pez cebra alimentadas con dieta alta en grasa. A la izquierda, fotografía representativa de los gránulos de lípidos en el hígado en campo claro y a su lado, la imagen binarizada con ImageJ. El área representa un porcentaje de espacio negro o blanco, en microscopio de campo claro (UPRIGHT) con aumento de 100x y se utilizó como método una doble tinción (SBB-RO).

Tamaño de gotas de lipido en hígado

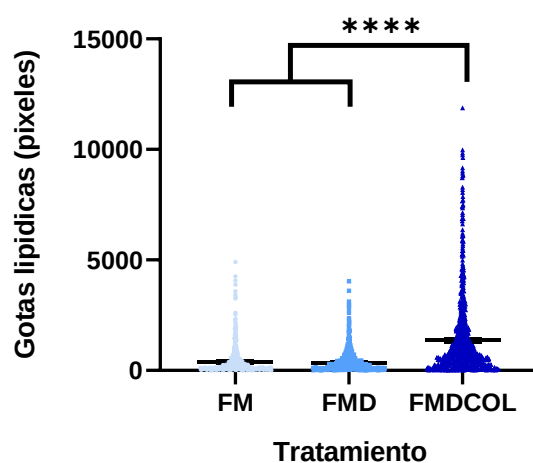


Figura 12: Tamaño de gotas de lípido en hígado diseccionado desde larvas pez cebra alimentadas con dieta alta en grasa. La densidad que mide el área

del porcentaje de espacio negro o blanco (sin lípidos) que representando las gotas de lípidos en hígado, mediante el uso del programa imageJ. Test ANOVA

**** $p < 0.0001$

DISCUSIÓN

El desarrollo de la enfermedad arterial coronaria (CAD) está fuertemente influenciado por la aterogénesis temprana, un proceso complejo que se inicia en etapas tempranas de la vida y causa acumulación de lípidos y células inflamatorias en los vasos sanguíneos, formando en etapas más avanzadas placas ateroscleróticas que pueden obstruir el flujo sanguíneos y desencadenar problemas cardiovasculares graves.

La aterogénesis temprana implica una compleja interacción entre varios factores de riesgo y mecanismos biológicos como los antecedentes familiares de enfermedad cardiovascular, el tabaquismo, la hipertensión arterial, la diabetes mellitus, la dislipidemia, la obesidad, la dieta poco saludable y la falta de actividad física, todos ellos son factores destacados, que contribuyen a la formación de lesiones en la pared arterial a la disfunción endotelial y acumulación de lipoproteínas en los vasos sanguíneos. Es por esto que en esta tesis se propuso desarrollar un modelo de aterogénesis temprana basado en el uso de las larvas de pez cebra usando una dieta alta en colesterol.

Nuestros resultados muestran que a pesar de que los datos de mortalidad no existen diferencias significativas entre los tres tratamientos (figura 5), la tendencia al aumento de la mortalidad a lo largo del tiempo sugiere que la dieta alta en grasa no influye en la salud y el bienestar de los peces. La mortalidad observada podría estar asociada con factores físicos, tales como el cambio de cajas con agua filtrada y la limpieza en las cajas, esto puede aumentar la mortalidad de las

larvas. Estos factores pueden generar estrés y contaminación, lo que a su vez afecta negativamente la salud de los peces y su capacidad para sobrevivir. Esto sugiere la sensibilidad de las larvas de pez cebra a diferentes condiciones ambientales y de alimentación. Por otro lado, los resultados sugieren que las larvas que forman parte del grupo FMDCOL no son más susceptibles a las condiciones adversas en comparación con las larvas de otros grupos.

Es importante tener en cuenta que la mortalidad acumulada puede estar influenciada por una variedad de factores, no solo la dieta, como señalan algunos autores (Fermann *et al.*, 2019). Se pueden proponer medidas específicas para mejorar la supervivencia de los peces cebra en condiciones de cautiverio, como el control más estricto de los factores físicos y la optimización de la dieta. Esto podría incluir el desarrollo de protocolos de limpieza más rigurosos, el ajuste de la cantidad de alimento por caja y la exploración de diferentes tipos de alimentos para determinar cuáles son más beneficiosos para la salud de los peces.

La correlación entre la dieta alta en colesterol y la patología vascular en larvas de pez cebra observada en nuestro estudio, encuentra respaldo significativo en la literatura existente. Investigaciones previas, como las realizadas por Stoletov *et al.*, (2009) y Torres *et al.*, (2015) en larvas, han demostrado que un alto contenido de colesterol en la dieta no solo induce una acumulación de lípidos en las paredes vasculares sino que también promueve el reclutamiento de células inflamatorias, incrementando el riesgo de aterosclerosis y otras enfermedades cardiovasculares. Esta relación es clave para entender cómo modificaciones dietéticas específicas pueden influir en la morfología y la fisiología cardiovascular en modelos biológicos. Además, Forn-Cuní *et al.*, (2015) y Landgraf *et al.*, (2017)

han extendido estas observaciones al demostrar que el pez cebra sometido a dietas ricas en grasas experimenta un incremento en el peso corporal, en la acumulación de tejido adiposo y en la carga cardiovascular. Estos estudios destacan que las alteraciones metabólicas asociadas con dietas altas en grasas son similares entre los peces cebra y los mamíferos, subrayando la relevancia del pez cebra como un modelo eficaz para investigar las patologías humanas relacionadas con la dieta.

En nuestro estudio, el uso de la tinción sudan black ha permitido visualizar directamente la acumulación de lípidos en el sistema vascular en el grupo FMDCOL, comparado con los grupos FM y FMD. Esto no solo confirma los hallazgos previos sobre la inducción de procesos inflamatorios tempranos sino también demuestra un aumento notable en el tamaño y tejido adiposo de las larvas, lo que es consistente con los hallazgos de Luo *et al.*, (2019), quienes observaron un aumento en el reclutamiento de células mieloides en larvas transgénicas alimentadas con dietas altas en colesterol.

Nuestros resultados indican que la dieta alta en colesterol promueve efectos adversos significativos sobre la salud vascular en el pez cebra, incluyendo el inicio de procesos inflamatorios y una mayor acumulación de tejido adiposo. La correlación observada entre la inflamación, la obesidad y la aterosclerosis en este modelo zoológico ofrece una plataforma invaluable para futuras investigaciones que busquen desentrañar los mecanismos moleculares subyacentes y explorar intervenciones terapéuticas para enfermedades cardiovasculares asociadas a la dieta.

Por otro lado, los hallazgos presentados en este estudio amplían nuestra comprensión sobre el papel de la proteína C reactiva (PCR) en la fisiopatología de enfermedades cardiovasculares, particularmente en relación con la inflamación y la aterogénesis. Coincidiendo con estudios en seres humanos (Amezcu-Guerra *et al.*, 2007), observamos que niveles elevados de PCR en larvas de pez cebra alimentadas con una dieta alta en colesterol (FMDCOL) están asociados con un aumento de la inflamación vascular, indicado por un incremento en la expresión de marcadores inflamatorios como TNF- α e IL-1 β (Luo *et al.*, 2019). Los mecanismos por los cuales la PCR contribuye al desarrollo y progresión de la aterosclerosis son diversos y complejos. La capacidad de la PCR para unirse a lipoproteínas alteradas y activar parcialmente el sistema del complemento, junto con su propiedad de inducir la producción de factor tisular por los macrófagos activados, sugiere un papel central en la modulación de la respuesta inflamatoria y la cascada de coagulación (Ballou *et al.*, 1992; Williams *et al.*, 2004). Nuestros resultados, que muestran un aumento significativo en los niveles de PCR en el grupo FMDCOL en comparación con el grupo control, respaldan la hipótesis de que una dieta alta en colesterol induce una respuesta inflamatoria sistémica en larvas de pez cebra. Este hallazgo es especialmente relevante dado que la PCR se ha propuesto como un marcador potencial para predecir el riesgo de eventos cardiovasculares adversos en humanos (Amezcu-Guerra *et al.*, 2007). Sin embargo, es importante destacar que la literatura existente no describe específicamente los niveles de PCR en larvas de pez cebra, lo que resalta la originalidad de nuestros resultados en este modelo animal. Aunque nuestros resultados sugieren una asociación entre la dieta alta en colesterol, la PCR y la

inflamación vascular, se necesita más investigación para comprender completamente los mecanismos subyacentes y sus implicaciones clínicas. Los futuros estudios podrían centrarse en investigar las vías de señalización molecular que regulan la expresión de PCR en respuesta a dietas hipercolesterolémicas, así como en LOX-1, un receptor de captación de lípidos en macrófagos. Este receptor incrementa la absorción de OxLDL cuando es estimulado por citoquinas proinflamatorias y otros estímulos, promoviendo la formación de células espumosas. Además, podrían explorar intervenciones terapéuticas potenciales dirigidas a mitigar los efectos adversos de la inflamación vascular en modelos animales y, eventualmente, en humanos.

En nuestro estudio, hemos investigado el perfil lipídico y sus implicaciones en la aterogénesis en larvas de pez cebra alimentadas con una dieta rica en colesterol. Nuestros hallazgos muestran que, a diferencia de lo observado en investigaciones previas en peces adultos, no se observaron alteraciones significativas en los niveles de triglicéridos, colesterol total, HDL y glucosa en las larvas de pez cebra sometidas a la una dieta aterogénica durante un período de 10 días. Al revisar la literatura, encontramos que otros estudios en peces adultos han mostrado un aumento en los niveles plasmáticos de triglicéridos y colesterol, así como una acumulación ectópica de lípidos hepáticos en el pez cebra sobrealimentado con una dieta alta en colesterol (Stoletov et al., 2019). Sin embargo, en nuestro estudio con larvas de pez cebra (5 días pos fecundación), no observamos estos mismos cambios en el perfil lipídico, lo que sugiere posibles diferencias en la respuesta metabólica entre larvas y peces adultos. Además, notamos que la

diferencia en los niveles de glucosa entre los grupos fue normales en nuestros estudio, en comparación a otros autores como Stoletov et al., 2019 lo que podría reflejar la corta duración del mismo (10 días de alimentación). Esto nos lleva a especular que el modesto aumento en los niveles de glucosa en sangre podría representar alteraciones tempranas del metabolismo de la glucosa relacionadas con la obesidad, pero no necesariamente una manifestación completa de la enfermedad.

Una posible explicación para la discrepancia entre nuestros hallazgos y los de estudios previos en peces adultos podría ser la edad de las larvas de pez cebra en nuestro estudio y tiempo de alimentación. Además, es posible que las larvas no presenten las mismas respuestas metabólicas que los peces adultos, lo que podría influir en los resultados del perfil lipídico y glucosa. Para abordar estas incertidumbres, proponemos realizar más réplicas de análisis para el perfil lipídico en larvas de pez cebra, así como prolongar el período de alimentación a 15 días para evaluar si hay alteraciones adicionales en el perfil lipídico.

Al realizar estudios histológicos con SBB se vio una acumulación de lípido en el sistema vascular de las larvas alimentadas con un alto contenido de colesterol, lo cual se correlaciona con el estado inflamatorio observado.

La aterosclerosis es una enfermedad crónica que afecta principalmente a las arterias del sistema cardiovascular, pero también puede tener consecuencias en el hígado. La inflamación crónica en el hígado es un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades hepáticas, como la esteatosis hepática no alcohólica (EHNA) y la esteatosis por hepatitis no alcohólica (EHNA), que se caracterizan

por la acumulación de grasa en las células hepáticas e inflamación (Lahoz y Mostaza 2007). Según los resultados presentados en la figura 8 en donde fue posibles niveles elevados de Aspartato Aminotransferasa (AST) y el tiempo de protrombina (TP) en el grupo FMDCOL, lo cual está asociada en humanos con enfermedades hepáticas. Por otro lado, se observó concentraciones de LDH aumentadas en FMDCOL que se han vinculado con lesiones hepáticas, como necrosis, y alteraciones músculo esqueléticas (Moreno *et al* 2007). Estos resultados indican posibles implicaciones para la salud del grupo FMDCOL, destacando la importancia de estos marcadores en la evaluación de la función hepática, así como su posible relación con enfermedades cardiovasculares y en consecuencia de la aterosclerosis temprana. Los resultados del perfil hepático y lipídico por métodos calorímetros no han sido previamente descritos por otros autores en larvas de pez cebra y representan las primeras evidencias de cambios bioquímicos asociados a la dieta en este modelo animal.

Los hallazgos presentados en este estudio proporcionan evidencia de la acumulación de lípidos, en larvas de pez cebra alimentadas con una dieta alta en colesterol (FMDCOL), en comparación con los grupos de control FM y FMD. La utilización del método de doble tinción (SBB+RO) y la extracción de hígados para el análisis de gotas de lípidos reveló un aumento significativo en el tamaño de las gotas de lípidos en el grupo FMDCOL, validado por el análisis de área con el programa ImageJ. Estos resultados concuerdan con investigaciones previas que sugieren que una dieta rica en grasas o colesterol puede inducir la acumulación de lípidos en el hígado, lo que lleva a la esteatosis hepática (Chen *et al.*, 2018;

Torres *et al.*, 2015). La observación de esteatosis hepática en larvas de pez cebra expuestas a una dieta alta en colesterol es coherente con la comprensión actual de los efectos adversos de la dieta en la salud hepática. Estudios en modelos animales y humanos han demostrado que una dieta rica en grasas o azúcares puede desencadenar la esteatosis hepática, la obesidad y la resistencia a la insulina (Torres *et al.*, 2015). La acumulación de lípidos en el hígado, como resultado de la sobrealimentación con dietas altas en grasas o colesterol, puede llevar a una serie de trastornos metabólicos y aumentar el riesgo de enfermedades cardiovasculares y metabólicas.

Es importante destacar que nuestros resultados respaldan y amplían los hallazgos previos al utilizar un método de SBB, doble tinción y perfil bioquímico para caracterizar la acumulación de lípidos de manera más precisa y cuantitativa. Además, nuestra observación de esteatosis hepática en larvas de pez cebra alimentadas con una dieta alta en colesterol agrega evidencia adicional al papel perjudicial de una dieta desequilibrada en la salud hepática.

En conclusión, nuestros datos respaldan la idea de que las larvas de pez cebra alimentadas con una dieta alta en colesterol presentan una mayor acumulación de lípidos y procesos de inflamación localizada y la presencia de esteatosis hepática. Estos hallazgos tienen implicaciones importantes para comprender los efectos de la dieta en la salud metabólica y cardiovascular, y sugieren la necesidad de intervenciones dietéticas para prevenir o mitigar los efectos adversos de la esteatosis hepática, la aterosclerosis y las enfermedades cardiovasculares derivadas, todas relacionadas con la dieta.

A pesar de todas las complicaciones metodológicas propias de este trabajo, comprobamos que efectivamente el tratamiento con una dieta alta en colesterol al 4%p/p (FMDCOL) en larvas de pez cebra, arroja resultados que indican una enfermedad temprana de aterogénesis.

Este estudio marca un precedente respecto a nuevas formas de medir la aterogénesis temprana, solucionando los problemas metodológicos mencionados en la cual se podría implementar como modelo de estudio en pez cebra.

CONCLUSIÓN

1. Se acepta la hipótesis planteada ya que nuestros resultados indican que efectivamente las larvas de pez cebra inducida a una alimentación elevada de colesterol, presentan evidencias de aterogénesis temprana, particularmente una acumulación de lípidos e inflamación vascular.
2. La investigación subraya la importancia de la dieta y las condiciones ambientales en la supervivencia de los peces cebra, destacando cómo la gestión del entorno y la limpieza afectan su bienestar. Aunque no se detectaron diferencias significativas en mortalidad entre los grupos estudiados, se enfatiza la necesidad de optimizar la alimentación y las condiciones de manejo para mejorar la salud y supervivencia de las larvas en cautiverio.
3. La obesidad también está vinculada a otros factores que aumentan el riesgo de aterosclerosis. Por lo tanto, el aumento en la talla en larvas de pez cebra tratadas con la dieta aterogénica puede ser un reflejo de este factores de riesgo, que es fundamental evaluar para prevenir la progresión de la aterosclerosis y reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares.
4. La utilización de la tinción sudan black en nuestro estudio ha permitido confirmar la inducción de procesos inflamatorios tempranos y una mayor acumulación de lípido en larvas alimentadas con dietas altas en colesterol, alineándose con estudios previos.

5. El papel de la proteína C reactiva (PCR) en la patología cardiovascular, especialmente en relación con la inflamación y la aterogénesis. Nuestros hallazgos respaldan la idea de que una dieta alta en colesterol induce una respuesta inflamatoria sistémica en larvas de pez cebra, lo que podría tener implicaciones significativas para el riesgo de enfermedades cardiovasculares.
6. El perfil bioquímico puede ser utilizada como una herramienta para monitorear la salud de las larvas de pez cebra, pudiendo detectar variaciones previas, a la observación de los signos clínicos de la enfermedad aterosclerótica.
7. El perfil hepático en larvas de pez cebra alimentadas con una dieta alta en colesterol revelan niveles elevados de enzimas hepáticas como AST y LDH, así como un tiempo prolongado de protrombina, sugiriendo posibles lesiones hepáticas y alteraciones musculares. Estos hallazgos resaltan la importancia de estos marcadores en la evaluación de la función hepática y muscular, y plantean posibles implicaciones para la salud, incluyendo enfermedades cardiovasculares y aterosclerosis temprana.
8. La doble tinción (SBB+RO) emerge como una herramienta eficaz para evaluar la acumulación de gránulos de lípidos en el hígado de larvas de pez cebra expuestas a una dieta alta en colesterol. Este método proporciona una respuesta visual clara que indica la presencia y el aumento de lípidos hepáticos, lo que respalda la asociación entre la dieta rica en colesterol y la esteatosis hepática en este modelo animal

9. Estos métodos de histología ofrecen una respuesta visual clara, facilitando la investigación sobre los efectos de la dieta aterogénica en la salud y cardiovascular en este modelo animal en larvas de pez cebra.
10. Los desarrollos recientes en el estudio de la etiología molecular de la enfermedad cardiovascular y aterosclerosis, sugieren que el pez cebra puede ser un buen sistema para modelar la enfermedad cardiovascular humana y buscar fármacos para su tratamiento.
11. El pez cebra es un modelo de última generación para el estudio de diversas enfermedades humanas, incluyendo a las enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis, y su uso podría contribuir significativamente al descubrimiento de fármacos más eficientes y confiables, con una menor tasa de abandono de fase temprana y tardía y mayores tasas de éxito terapéutico.

BIBLIOGRAFÍA

- Amezcua-Guerra, Luis M, Springall del Villar, Rashidi, & Bojalil Parra, Rafael. (2007). Proteína C reactiva: aspectos cardiovasculares de una proteína de fase aguda. Archivos de cardiología de México, 77(1), 58-66. Recuperado en 23 de abril de 2024, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-99402007000100009&lng=es&tlng=es.
- Anderson JL, Carten JD, Farber SA. Zebrafish lipid metabolism: from mediating early patterning to the metabolism of dietary fat and cholesterol. *Methods Cell Biol.* 2011;101:111–41.
- Anitschkow N. Über die Veränderungen der Kaninchenaorta bei experimenteller Cholesterinsteatose. *Beiträge zur Pathologischen Anatomie und zur Allgemeinen Pathologie.* 1913; 56:379-404.
- Babin PJ, Thisse C, Durliat M, Andre M, Akimenko MA, Thisse B. Los genes de apolipoproteína E y AI están presentes en un vertebrado no mamífero y se expresan altamente durante el desarrollo embrionario. *Proc Natl Acad Sci EE.UU. A.* 1997; 94 : 8622–7.
- Babin PJ, Vernier JM. Lipoproteínas plasmáticas en peces. *J Res de lípidos.* 1989; 30 : 467–89.
- Badimon, L., Vilahur, G., Padro, T., Lipoproteins, platelets, and atherothrombosis. *Rev Esp Cardiol.* 2009; 62(10):1161-78.
- Ballou SP, Lozanski G: Induction of inflammatory cytokine release from cultured human monocytes by C-reactive protein. *Cytokine* 1992; 4: 361–8. [Links]
- Barakat HA, St Clair RW. Characterization of plasma lipoproteins of grain and cholesterol-fed White Carneau and Show Racer pigeons. *J Lipid Res.* 1985;26:1252-68.
- Barbieri, S. S., Cavalca, V., Eligini, S., Brambilla, M., Caiani, A., Tremoli, E., & Colli, S. (2004). Apocynin prevents cyclooxygenase 2 expression in

human monocytes through NADPH oxidase and glutathione redox-dependent mechanisms. *Free radical biology & medicine*, 37(2), 156–165.

- Berridge, B. R., Schultze, A. E., Heyen, J. R., Searfoss, G. H., and Sarazan, R. D. Technological advances in cardiovascular safety assessment decrease preclinical animal use and improve clinical relevance. *ILAR J.* (2016) 57, 120–132.
- Brousseau ME, Hoeg JM. Transgenic rabbits as models for atherosclerosis research. *J Lipid Res.* 1999;40:365-75.
- Buckley C1, Bund Sj, Mctaggart F, Bruckdorfer Kr, Oldham A, Jacobs M. Oxidized low-density lipoproteins inhibit endothelium-dependent relaxations in isolated large and small rabbit coronary arteries. *J Auton Pharmacol.* 1996; 16(5):261-7.
- Caravaca-Fontán, Fernando, Azevedo, Lilia, Bayo, Miguel Ángel, Gonzales-Candia, Boris, Luna, Enrique, & Caravaca, Francisco. (2017). Niveles séricos elevados de gamma-glutamyl transferasa y fosfatasa alcalina son predictores independientes de mortalidad en la enfermedad renal crónica estadio 4-5. *Nefrología(Madrid)*, 37(3),267-75.
- Carr, A. C., McCall, M. R., & Frei, B. (2000). Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 20(7), 1716–1723.
- Casacuberta AM, Escola-Gil JC, Julve-Gil J, González-Sastre F, Blanco-Vaca F. Modificación genética de animales de laboratorio (I): metabolismo lipoproteico y arteriosclerosis. *Clin Invest Arterioscl.* 1998;10:19-31.
- Chapman MJ. Comparative analysis of mammalian plasma lipoproteins. *Methods in Enzymology.* 1986;128:70-143.
- Chen L, Qin L, Liu X, Meng X. CTRP3 Alleviates Ox-LDL-Induced Inflammatory Response and Endothelial Dysfunction in Mouse Aortic Endothelial Cells by Activating the PI3K/Akt/eNOS Pathway. *Inflammation.* 2019; 42(4):1350-1359.

- Chen, B., Zheng, Y. M., & Zhang, J. P. (2018). Comparative Study of Different Diets-Induced NAFLD Models of Zebrafish. *Frontiers in endocrinology*, 9, 366. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00366>
- Chen, K., Febbraio, M., Li, W., & Silverstein, R. L. (2008). A specific CD36-dependent signaling pathway is required for platelet activation by oxidized low-density lipoprotein. *Circulation research*, 102(12), 1512–1519.
- Chen, K., Li, W., Major, J., Rahaman, S. O., Febbraio, M., & Silverstein, R. L. (2011). Vav guanine nucleotide exchange factors link hyperlipidemia and a prothrombotic state. *Blood*, 117(21), 5744–5750.
- Chen, M., Masaki, T., & Sawamura, T. (2002). LOX-1, the receptor for oxidized low-density lipoprotein identified from endothelial cells: implications in endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Pharmacology & therapeutics*, 95(1), 89–100.
- Childs S, Weinstein BM, Mohideen MA, Donohue S, Bonkovsky H, Fishman MC. Zebrafish dracula encodes ferrochelatase and its mutation provides a model for erythropoietic protoporphyria. *Curr Biol*. 2000;10(16):1001–4.
- Cominacini, L., Fratta Pasini, A., Garbin, U., Pastorino, A., Rigoni, A., Nava, C., Davoli, A., Lo Cascio, V., & Sawamura, T. (2003). The platelet-endothelium interaction mediated by lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 reduces the intracellular concentration of nitric oxide in endothelial cells. *Journal of the American College of Cardiology*, 41(3), 499–507.
- Cominacini, L., Rigoni, A., Pasini, A. F., Garbin, U., Davoli, A., Campagnola, M., Pastorino, A. M., Lo Cascio, V., & Sawamura, T. (2001). The binding of oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) to ox-LDL receptor-1 reduces the intracellular concentration of nitric oxide in endothelial cells through an increased production of superoxide. *The Journal of biological chemistry*, 276(17), 13750–13755.
- Cook, D., Brown, D., Alexander, R., March, R., Morgan, P., Satterthwaite, G., *et al.* Lessons learned from the fate of AstraZeneca's drug pipeline: a fivedimensional framework. *Nat. Rev. Drug Discov.* (2014) 13, 419–431.

- Cornet, C., Calzolari, S., Miñana-Prieto, R., Dyballa, S., van Doornmalen, E., Rutjes, H., Savy, T., D'Amico, D., & Terriente, J. (2017). ZeGlobalTox: An innovative approach to address organ drug toxicity using zebrafish. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(4), 1–19. <https://doi.org/10.3390/ijms18040864>.
- Crowhurst MO, Layton JE, Lieschke GJ. Developmental biology of zebrafish myeloid cells. *Int J Dev Biol*. 2002;46(4):483-492.
- Cubilos, M.A. (2017). *Pez cebra como modelo de investigación biomédica*. Researchgate. Recuperado de: <https://www.researchgate.net>
- Curtiss, L. K., Black, A. S., Takagi, Y., & Plow, E. F. (1987). New mechanism for foam cell generation in atherosclerotic lesions. *The Journal of clinical investigation*, 80(2), 367–373.
- Daley SJ, Herderick EE, Cornhill JF, Rogers KA. Cholesterol-fed and casein-fed rabbit models of atherosclerosis, I: differing lesion area and volume despite equal plasma cholesterol levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1994;14:95-104.
- Danesh, B. J., Brunton, J., and Sumner, D. J. Comparison between shortterm renal haemodynamic effects of propranolol and nadolol in essential hypertension: a cross-over study. *Clin. Sci.* (1984) 67, 243–248.
- Daub, K., Seizer, P., Stellos, K., Krämer, B. F., Bigalke, B., Schaller, M., Fateh-Moghadam, S., Gawaz, M., & Lindemann, S. (2010). Oxidized LDL-activated platelets induce vascular inflammation. *Seminars in thrombosis and hemostasis*, 36(2), 146–156.
- Dietschy JM, Turley SD, Spady DK. Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans. *J. Lipid Res*. 1993; 34:1637-59.
- Driever W, Fishman MC. The zebrafish: heritable disorders in transparent embryos. *J Clin Invest*. 1996;97(8):1788–94.
- Fang L, Liu C1, Miller YI. Zebrafish models of dyslipidemia: relevance to atherosclerosis and angiogenesis. *Transl Res*. 2014; 163(2):99-108.

- Fehrmann-Cartes, K., Coronado, M., Hernández, A. J., Allende, M. L., & Feijoo, C. G. (2019). Anti-inflammatory effects of aloe vera on soy meal-induced intestinal inflammation in zebrafish. *Fish & shellfish immunology*, 95, 564–573. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.10.075>
- Forn-Cuní, G., Varela, M., Fernández-Rodríguez, C. M., Figueras, A., & Novoa, B. (2015). Liver immune responses to inflammatory stimuli in a diet-induced obesity model of zebrafish. *The Journal of endocrinology*, 224(2), 159–170. <https://doi.org/10.1530/JOE-14-0398>
- Förstermann, U., & Sessa, W. C. (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *European heart journal*, 33(7), 829–837d.
- Frostegard, J.; Haegerstrand, A.; Gidlund, M.; Nilsson, J. Biologically modified LDL increases the adhesive properties of endothelial cells. *Atherosclerosis* 90:119-126; 1991.
- Getz GS, Reardon CA. Animal models of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(5):1104–15.
- Giannaccini, A. Cuschieri, L. Dente, V. Raffa, Non-mammalian vertebrate embryos as models in nanomedicine, *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* 2014;10: 703–719.
- Gonzalez-Moragas, P. Berto, C. Vilches, R. Quidant, A. Kolovou, R. Santarella- Mellwig, Y. Schwab, S. Stürzenbaum, A. Roig, A. Laromaine, *In vivo* testing of gold nanoparticles using the *Caenorhabditis elegans* model organism, *Acta Biomater.* 2017;53: 598–609.
- González-Rosa JM. Zebrafish Models of Cardiac Disease: From Fortuitous Mutants to Precision Medicine. *Circ Res.* 2022; 130(12):1803-1826.
- Greeve J, Altkemper I, Dieterich JH, Greten H, Windler E. Apolipoprotein B mRNA editing in 12 different mammalian species: hepatic expression is reflected in low concentrations of apoBcontaining plasma lipoproteins. *J Lipid Res.* 1993;34:1367-83.
- Griendling KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury. Part II: animal and human studies. *Circulation.* 2003; 108:2034-40.

- Hadjiisky P, Bourdillon M, Grosogeat Y. Modèles expérimentaux d'athérosclérose. Apports, limites et perspectives. Arch Mal Coer. 1991;84:1593-603.
- Han J, Zhang R, Zhang X, Dong J, Chen M, Pan Y, Liao Z, Zhong M, He J, Wang F, Yue Y, Shang J. Zebrafish Model for Screening Antiatherosclerosis Drugs. Oxid Med Cell Longev. 2021; 2021:9995401.
- Holzgrefe, H., Ferber, G., Champeroux, P., Gill, M., Honda, M., Greiter-Wilke, A., *et al.* Preclinical QT safety assessment: cross-species comparisons and human translation from an industry consortium. J. Pharmacol. Toxicol. Methods (2014) 69, 61–101.
- Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., *et al.* The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. Nature (2013) 496, 498–503
- Hsieh, C. C., Yen, M. H., Yen, C. H., & Lau, Y. T. (2001). Oxidized low density lipoprotein induces apoptosis via generation of reactive oxygen species in vascular smooth muscle cells. Cardiovascular research, 49(1), 135–145
- Jerome WG, Lewis JC. Early atherogenesis in White Carneau pigeons: II: ultrastructural and cytochemical observations. Am J Pathol. 1985;119:210-22.
- K. Fehrmann-Cartes, M. Coronado, A.J. Hernández, M.L. Allende, C.G. Feijoo, Anti-inflammatory effects of aloe vera on soy meal-induced intestinal inflammation in zebrafish, Fish & Shellfish Immunology, Volume 95, 2019, Pages 564-573, ISSN 1050-4648.
- Ka J, Jin SW. Zebrafish as an emerging model for dyslipidemia and associated diseases. J Lipid Atheroscler. 2021;10(1):42–56.
- Kakutani, M., Masaki, T., & Sawamura, T. (2000). A platelet-endothelium interaction mediated by lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(1), 360–364.

- Kataoka, H., Kume, N., Miyamoto, S., Minami, M., Moriwaki, H., Murase, T., Sawamura, T., Masaki, T., Hashimoto, N., & Kita, T. (1999). Expression of lectinlike oxidized low-density lipoprotein receptor-1 in human atherosclerotic lesions. *Circulation*, 99(24), 3110–3117.
- Khor ES, Noor SM, Wong PF. Understanding the role of ztor in aging-related diseases using the zebrafish model. *In Vivo*. 2019;33(6):1713–20.
- Kohno, M., Yokokawa, K., Yasunari, K., Minami, M., Kano, H., Hanehira, T., & Yoshikawa, J. (1998). Induction by lysophosphatidylcholine, a major phospholipid component of atherogenic lipoproteins, of human coronary artery smooth muscle cell migration. *Circulation*, 98(4), 353–359
- Lavery, H., Benson, C., Cartwright, E., Cross, M., Garland, C., Hammond, T., *et al.* How can we improve our understanding of cardiovascular safety liabilities to develop safer medicines? *Br. J. Pharmacol.* (2010) 163, 675–693.
- Lee MT, Bonneau AR, Takacs CM, Bazzini AA, DiVito KR, Fleming ES, *et al.* Nanog, Pou5f1 and SoxB1 activate zygotic gene expression during the maternal-to-zygotic transition. *Nature*. 2013;503(7476):360–4.
- Lee, S. Lee, J. Choi, J.H. Park, K.M. Kim, J.G. Jee, J.S. Bae, Antithrombotic properties of JJ1, a potent and novel thrombin inhibitor, *Scientific reports*. 2017; 7(1) 14862.
- Leishman, D. J., Beck, T. W., Dybdal, N., Gallacher, D. J., Guth, B. D., Holbrook, M., *et al.* Best practice in the conduct of key nonclinical cardiovascular assessments in drug development: current recommendations from the safety pharmacology society. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* (2012) 65, 93–101.
- Leiva, E., Wehinger, S., Guzmán, L. y Orrego, R. (2015). Papel del LDL oxidado en la aterosclerosis. *En tecnología*. doi: 10.5772/59375
- Lester, R. M., and Olbertz, J. Early drug development: assessment of proarrhythmic risk and cardiovascular safety. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* (2016) 9, 1611–1618.

- Li, D., & Mehta, J. L. (2000). Antisense to LOX-1 inhibits oxidized LDL-mediated upregulation of monocyte chemoattractant protein-1 and monocyte adhesion to human coronary artery endothelial cells. *Circulation*, 101(25), 2889–2895.
- Li, D., Chen, H., Romeo, F., Sawamura, T., Saldeen, T., & Mehta, J. L. (2002). Statins modulate oxidized low-density lipoprotein-mediated adhesion molecule expression in human coronary artery endothelial cells: role of LOX-1. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 302(2), 601–605.
- López-Jiménez F, Jacobsen SJ, Reeder GS, Weston SA, Meverden RA, Roger V.L..Prevalence and secular trends of excess body weight and impact on outcomes after myocardial infarction in the community..*Chest*, 125 (2004), pp. 1205-1212
- Luo H, Li QQ, Wu N, Shen YG, Liao WT, Yang Y, Dong E, Zhang GM, Liu BR, Yue XZ, Tang XQ, Yang HS. Chronological *in vivo* imaging reveals endothelial inflammation prior to neutrophils accumulation and lipid deposition in HCD-fed zebrafish. *Atherosclerosis*. 2019 Nov;290:125-135. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2019.09.017. Epub 2019 Sep 27. PMID: 31614249.
- MacRae, C. A., and Peterson, R. T. Zebrafish as tools for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* (2015) 14, 721–731.
- Maiolino, G., Rossitto, G., Caielli, P., Bisogni, V., Rossi, G. P., & Calò, L. A. (2013). The role of oxidized low-density lipoproteins in atherosclerosis: the myths and the facts. *Mediators of inflammation*, 2013, 714653
- Mak A, Kow Ny. Imbalance between endothelial damage and repair: a gateway to cardiovascular disease in systemic lupus erythematosus. *Biomed Res Int*. 2014:17872.
- Milani-Nejad, N., and Janssen, P. M. L. Small and large animal models in cardiac contraction research: advantages and disadvantages. *Pharmacol. Ther.* (2014) 141, 235–249.

- Mitra, S., Goyal, T., & Mehta, J. L. (2011). Oxidized LDL, LOX-1 and atherosclerosis. *Cardiovascular drugs and therapy*, 25(5), 419–429.
- Moccia F, Tanzi F, Munaron L. Endothelial remodelling and intracellular calcium machinery. *Curr Mol Med*. 2014. 14(4):457-480.
- Moreno Borque, A., González Moreno, L., Mendoza-Jiménez, J., García-Buey, L., & Moreno Otero, R.. (2007). Utilidad de los parámetros analíticos en el diagnóstico de las enfermedades hepáticas. *Anales de Medicina Interna*, 24(1), 38-46.
- Nagashima M, McLean JW, Lawn RM. Cloning and mRNA tissue distribution of rabbit cholesteryl ester transfer protein. *J Lipid Res*. 1988;29:1643-9.
- Nagy, L., Tontonoz, P., Alvarez, J. G., Chen, H., & Evans, R. M. (1998). Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell*, 93(2), 229–240.
- Nishina P, Verstyft J, Paigen B. Synthetic low and high fat diets for the study of atherosclerosis in the mouse. *J Lipid Res*. 1990; 31:859-69.
- O'Hare, E. A., Wang, X., Montasser, M. E., Chang, Y. P., Mitchell, B. D., & Zaghloul, N. A. (2014). Disruption of *Idlr* causes increased LDL-c and vascular lipid accumulation in a zebrafish model of hypercholesterolemia. *Journal of lipid research*, 55(11), 2242–2253
- Otis JP, Zeituni EM, Thierer JH, Anderson JL, Brown AC, Boehm ED, *et al*. Zebrafish as a model for apolipoprotein biology: comprehensive expression analysis and a role for ApoA-IV in regulating food intake. *Dis Model Mech*. 2015; 8(3):295–309.
- Ouguerram K, Magot T, Lutton C. Alterations in cholesterol metabolism in the genetically hypercholesterolemic RICO rat: an overview. En: Malmendier CL, Alaupovic P, Brewer HB, Jr, editors. *Hypercholesterolemia, hypocholesterolemia, hypertriglyceridemia, in vivo kinetics*. New York: Plenum Press; 1991. p. 257-74.

- Paigen B, Morrow A, Brandon C, Mitchell D, Holmes P. Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice. *Atherosclerosis*. 1985;57:65-73.
- Park Y. M. (2014). CD36, a scavenger receptor implicated in atherosclerosis. *Experimental & molecular medicine*, 46(6), e99.
- Parker, T., Libourel, P., Hetheridge, M. J., Cumming, R. I., Sutcliffe, T. P., Goonesinghe, A. C., *et al.* A multi-endpoint *in vivo* larval zebrafish (*Danio rerio*) model for the assessment of integrated cardiovascular function. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* (2014) 69, 30–38.
- Passini, E., Britton, O. J., Lu, H. R., Rohrbacher, J., Hermans, A. N., Gallacher, D. J., *et al.* Human *in silico* drug trials demonstrate higher accuracy than animal models in predicting clinical pro-arrhythmic cardiotoxicity. *Front. Physiol.* (2017) 8, 668.
- Pirillo, A., Norata, G. D., & Catapano, A. L. (2013). LOX-1, OxLDL, and atherosclerosis. *Mediators of inflammation*, 2013, 152786.
- Podrez, E. A., Byzova, T. V., Febbraio, M., Salomon, R. G., Ma, Y., Valiyaveetil, M., Poliakov, E., Sun, M., Finton, P. J., Curtis, B. R., Chen, J., Zhang, R., Silverstein, R. L., & Hazen, S. L. (2007). Platelet CD36 links hyperlipidemia, oxidant stress and a prothrombotic phenotype. *Nature medicine*, 13(9), 1086–1095.
- Poirier P. Cardiologists and abdominal obesity: lost in translation? *Heart*. 2009 Jul;95(13):1033-5. doi: 10.1136/hrt.2009.171785. Epub 2009 Apr 26. PMID: 19398438.
- Quan, Y., Gong, L., He, J., Zhou, Y., Liu, M., Cao, Z., Li, Y., & Peng, C. (2019). Aloe emodin induces hepatotoxicity by activating NF-κB inflammatory pathway and P53 apoptosis pathway in zebrafish. *Toxicology Letters*, 306(1166), 66–79. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.02.007>
- Quinn, M. T., Parthasarathy, S., Fong, L. G., & Steinberg, D. (1987). Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during

atherogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(9), 2995–2998.

- Reyes, C.; Nova-Lamperti, E.; Durán-Sandoval, D.; Rojas, D.; Gajardo, J.; Guzmán-Gutiérrez, E.; Bustos-Ruiz, C.; Ormazábal, V.; Zúñiga, FA; Escudero, C.; *et al.* Loxin redujo la respuesta inflamatoria en el hígado y la formación de vetas grasas aórticas en ratones alimentados con una dieta rica en grasas. *En t. J. Mol. Ciencia*. 2022 , 23 , 7329. <https://doi.org/10.3390/ijms23137329>
- Robles, V. et al., 2009, “Germplasm Cryobanking in Zebrafish and Other Aquarium Model Species”, *Zebrafish*, 6(3): 281-293
- Ross AC, Minick CR, Zilvermit DB. Equal atherosclerosis in rabbits fed cholesterol-free, low-fat diet or cholesterol-supplemented diet. *Atherosclerosis*. 1978;29:301-15.
- Ryoo S, Bhunia A, Chang F, Shoukas A, Berkowitz DE, Romer LH. OxLDL-dependent activation of arginase II is dependent on the LOX-1 receptor and downstream RhoA signaling. *Atherosclerosis*. 2011;214(2):279-87.
- Santerre RF, Wight TN, Smith SC, Brannigan D. Spontaneous atherosclerosis in pigeons: a model system for studying metabolic parameters associated with atherogenesis. *Am J Pathol*. 1972;67: 1-22.
- Sarasamma, S. et al., 2017, “Zebrafish: A Premier Vertebrate Model for Biomedical Research in Indian Scenario”, en *Zebrafish*, 14(6): 589-605
- Schaeffer, D. F., Riaz, M., Parhar, K. S., Chen, J. H., Duronio, V., Sawamura, T., & Steinbrecher, U. P. (2009). LOX-1 augments oxLDL uptake by lysoPC-stimulated murine macrophages but is not required for oxLDL clearance from plasma. *Journal of lipid research*, 50(8), 1676–1684
- Schlegel A, Stainier DY. La proteína de transferencia microsomal de triglicéridos es necesaria para la utilización de los lípidos de la yema y la absorción de los lípidos de la dieta en las larvas de pez cebra. *Bioquímica*. 2006; 45 :15179–87.
- Schlegel A. Zebrafish Models for Dyslipidemia and Atherosclerosis Research. *Front Endocrinol. (Lausanne)*. 2016; 7:159.

- Schwenke DC, Carew TE. Initiation of atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits, I: focal increases in arterial LDL concentration precede development of fatty streak lesions. *Arteriosclerosis*. 1989;9:895-907.
- Searle A, Gómez-Rosso L, Meroño T, Salomon C, Durán-Sandoval D, Giunta G, Grant C, Calvo C, Lamperti L, Brites F, Aguayo C. High LDL levels are associated with increased lipoprotein-associated phospholipase A(2) activity on nitric oxide synthesis and reactive oxygen species formation in human endothelial cells. *Clin Biochem*. 2011; 44(2-3):171-7.
- Shiomi M, Ito T, Shiraishi M, Watanabe Y. Inheritability of atherosclerosis and the role of lipoproteins as risk factors in the development of atherosclerosis in WHHL rabbits: risk factors related to coronary atherosclerosis are different from those related to aortic atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 1992; 96: 43-52.
- Shiomi M, Ito T, Yamada S, Kawashima S, Fan J. Development of an Animal Model for Spontaneous Myocardial Infarction (WHHLMi Rabbit). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23: 1239-44.
- Sary, H.C. *et al.*, 1995. A Definition of Advanced Types of Atherosclerotic Lesions and a Histological Classification of Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 15, pp.1512–1531.
- Stiko-Rahm, A., Hultgårdh-Nilsson, A., Regnström, J., Hamsten, A., & Nilsson, J. (1992). Native and oxidized LDL enhances production of PDGF AA and the surface expression of PDGF receptors in cultured human smooth muscle cells. *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology*, 12(9), 1099–1109.
- Stoletov K, Fang L, Choi SH, Hartvigsen K, Hansen LF, Hall C, Pattison J, Juliano J, Miller ER, Almazan F, Crosier P, Witztum JL, Klemke RL, Miller YI. Vascular lipid accumulation, lipoprotein oxidation, and macrophage lipid uptake in hypercholesterolemic zebrafish. *Circ Res*. 2009;104(8):952-60.
- Tabas I, García-Cardena G, Owens Gk. Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis. *J Cell Biol*. 2015; 209(1):13-22.

- Tall A. Plasma cholesteryl ester transfer protein. *J Lipid Res.* 1993;34:1255-74.
- Tontonoz, P., Nagy, L., Alvarez, J. G., Thomazy, V. A., & Evans, R. M. (1998). PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell*, 93(2), 241–252.
- Torres-Villalobos, G., Hamdan-Pérez, N., Tovar, A. R., Ordaz-Nava, G., Martínez-Benítez, B., Torre-Villalvazo, I., Morán-Ramos, S., Díaz-Villaseñor, A., Noriega, L. G., Hiriart, M., Medina-Santillán, R., Castillo-Hernandez, M.delC., Méndez-Sánchez, N., Uribe, M., & Torres, N. (2015). Combined high-fat diet and sustained high sucrose consumption promotes NAFLD in a murine model. *Annals of hepatology*, 14(4), 540–546.
- Trede NS, Langenau DM, Traver D, Look AT, Zon LI. The use of zebrafish to understand immunity. *Immunity*. 2004;20(4):367-379.
- Valles, S., Gutiérrez López, E., & Bardullas, U. (2018). Implementación de un sistema para evaluar la neurotoxicidad de los contaminantes ambientales en larvas de pez cebra (*Danio rerio*). *Investigación y Ciencia*, 26 (74),25-31.
- Vandenburg, M. J., Holly, J. M., Goodwin, F. J., Sharman, V. L., and Marsh, F. P. The effect of captopril and propranolol on the responses to posture and isometric exercise in patients with essential hypertension. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* (1983) 25, 721–728.
- Varela, M., Figueras, A., & Novoa, B. (2017). Modelling viral infections usingzebrafish: innate immune response and antiviral research. *Antiviral research*, 139,59-68.
- Vargas, Rafael. (2017). *Pez cebra (Danio rerio) y anestesia. Un modelo animal alternativo para realizar investigación biomédica básica.* 29. 86-96.
- Vasyutina, M., Alieva, A., Reutova, O., Bakaleiko, V., Murashova, L., Dyachuk, V., Catapano, A. L., Baragetti, A., & Magni, P. (2022). The zebrafish model system for dyslipidemia and atherosclerosis research: Focus on environmental/exposome factors and genetic

mechanisms. *Metabolism: clinical and experimental*, 129, 155138.
<https://doi.org/10.1016/j.metabol.2022.155138>

- Viola J, Soehnlein O. Atherosclerosis - A matter of unresolved inflammation. *Semin Immunol*. 2015;27(3):184-9 Zang L, Maddison LA, Chen W. Zebrafish as a model for obesity and diabetes. *Front Cell Dev Biol*. 2018;6:91.
- Walters JW, Anderson JL, Bittman R, Pack M, Farber SA. La visualización del metabolismo de los lípidos en el intestino del pez cebra revela una relación entre la absorción de colesterol mediada por NPC1L1 y los ácidos grasos de la dieta. *Química Biol*. 2012; 19 : 913–25
- Wang, K., Fang, X., Ma, N., Lin, Q., Huang, Z., Liu, W., Xu, M., Chen, X., Zhang, W., & Zhang, Y. (2015). Myeloperoxidase-deficient zebrafish show an augmented inflammatory response to challenge with *Candida albicans*. *Fish and Shellfish Immunology*, 44(1), 109–116.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.01.038>.
- Warren RJ, Ebert DL, Mitchell A, Barter PJ. Rabbit hepatic lipase cDNA sequence: low activity is associated with low Messenger RNA levels. *J Lipid Res*. 1991;32:1333-9.
- Watanabe Y. Serial inbreeding of rabbits with hereditary hiperlipidemia (WHHL-rabbit). *Atherosclerosis*. 1980;36:261-8.
- Williams TN, Zhang CX, Game BA, He L, Huang Y: C–reactive protein stimulates MMP–1 expression in U937 histiocytes through FcγRII and extracellular signal–regulated kinase pathway: An implication of CRP involvement in plaque de stabilization. *Arterioscler Thromb Vase Biol* 2004; 24: 61–6. [Links]
- Yancey PG, St. Clair RW. Mechanism of the defect in cholesterol ester clearance from macrophages of atherosclerosis-susceptible white carneau pigeons. *J Lipid Res*. 1994;35:2114-29.
- Zang, L. et al., 2018, “Zebrafish as a Model for Obesity and Diabetes”, en *Frontiers in cell and developmental biology*, 6(91): 1-13.

ANEXO 1

Eliminación de material con residuos biológicos, químicos o radioactivos.

Toda gestión, manejo, acopio temporal y eliminación de residuos provenientes del proyecto se registrarán por el manual de manejo de residuos peligrosos de la Universidad de Concepción y cumpliéndose el decreto supremo N°148/2003 – “Reglamento sanitario sobre manejo de residuos peligrosos”. Y siguiendo las indicaciones por MATPEL



CLASIFICACIÓN Y MANEJO DE RESIDUOS BIOLÓGICOS



Tipo de Residuo	Definición	Almacenamiento y Retiro	Contenedor o bolsa
Residuos biológicos (tipo 1)	Corresponden SOLO a tejidos humanos, restos de tejidos humanos, materiales contaminados con fluidos humanos (sangre, orina) y restos de animales contaminados con bacterias o virus patógenos.	Deben ser almacenados a temperaturas inferiores a 4°C hasta ser retirados por la unidad RESPEL o empresa externa*.	Bolsa de autoclave amarilla 
Residuos cortopunzantes biológicos (tipo 2)	Corresponden a materiales cortopunzantes (agujas, lancetas, hojas de bisturí, escalpelos) que se han utilizado con fluidos y tejidos humanos o en disecciones de animales contaminados con bacterias o virus patógenos.	Deben ser almacenados a temperaturas inferiores a 4°C hasta ser retirados por la unidad RESPEL o empresa externa*.	Caja cortopunzante amarilla 
Residuos bio-inertes (tipo 3)	Corresponden a animales o restos de animales de experimentación que <u>NO</u> están contaminados con bacterias o virus patógenos u otras sustancias peligrosas.	Deben ser almacenados en bolsas para residuos inertes color negro, resistente al volumen y peso del residuo, a temperaturas inferiores a 4°C hasta ser retiradas por la unidad RESPEL para su disposición final. En caso de que el residuo corresponda a una muestra preservada, se debe separar de la fracción líquida (ej. formalina, alcohol), la que debe ser almacenada como residuo químico.	Bolsa para residuos inertes color negro 
Residuos cortopunzantes inertes (tipo 4)	Corresponden a materiales cortopunzantes (agujas, lancetas, hojas de bisturí, escalpelos) que <u>NO</u> han estado en contacto con tejidos humanos, restos de tejidos humanos, fluidos humanos (sangre, orina), ni restos de animales contaminados con bacterias o virus patógenos.	Deben ser almacenados en contenedores plásticos de 4 u 8 kg, etiquetados como “Cortopunzante inerte”, hasta ser retirados por la unidad RESPEL para su disposición final	Contenedor plástico 4 u 8 kg 
Residuos microbiológicos (tipo 5)	Corresponden a materiales de cultivo que han estado en contacto con bacterias no patógenas y que han sido inactivados por esterilización con autoclave o por desinfección en un baño con solución de hipoclorito de sodio.	Deben ser entregados a la unidad RESPEL, SOLO después de ser inertizados mediante autoclave o desinfectados en un baño con solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 1 hora. En caso contrario, no se procederá con el retiro. La unidad RESPEL entregará bolsas de autoclave solo cuando éste sea el método utilizado de inactivación.	Bolsa de autoclave transparente o blanca (solo para autoclave) 

(*) El retiro desde la Facultad de Medicina, Facultad de Odontología, DISE y Centro RAI, será una vez a la semana a través de empresa externa Stericycle y la unidad RESPEL. El resto de las facultades que generen este tipo de residuos deberá gestionar retiro mensual a través de la unidad RESPEL.

Instructivo elaborado en colaboración con la Facultad de Ciencias Biológicas.

Revisado 15-01-2016

ANEXO 2

Doble tinción de larvas de pez cebra con Sudan Black B y RedOil

1. Fijar larvas en PFA 4% por 2h a temperatura ambiente (RT), o toda la noche (ON) a 4°C.
2. Lavar en buffer fosfato salino (PBST) 3 veces por 5 min, en agitación constante (AC)
3. Teñir con solución de trabajo Sudan Black B filtrada (ideal 0,45 um) por dos horas, en AC.
4. Lavar por 5 min con etanol 70%. Observar bajo lupa, y repetir solo de ser necesario, en AC.
5. Lavar en buffer fosfato salino (PBST) 3 veces por 5 min, en AC.
6. Despigmentar en una solución de KOH 1%/H₂O₂ 3%, sin agitación por 10-12 min.

NOTA 1: Usar solución fresca, preparar justo antes de usar.

7. Lavar en PBS tres veces por 5 min, en AC.
8. Deshidratar en propilenglicol 75% por 10 min, en AC.
9. Deshidratar en propilenglicol 100% por 10 min, en AC.
10. Teñir con solución de RedOil al 0.5% en Propilenglicol 100% en AC, toda la noche.

NOTA 2: Usar solución filtrada (ideal 0,45 um) almacenada a RT en oscuridad. Duración aproximada en estas condiciones 5-6 días.

11. Lavar con propilenglicol 100% por 15 min dos veces, en AC.
12. Rehidratar en propilenglicol 75% por 25 min, en AC.
13. Rehidratar en propilenglicol 50% por 25 min, en AC.
14. Almacenar en glicerol 80% a 4°C en oscuridad.

NOTA 3: Usar todas las soluciones a temperatura ambiente.